

P: 9113 4/5

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-509467

第3部門第2区分

(43)公表日 平成7年(1995)10月19日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
A 6 1 K 51/00	A D U		
45/00	A B C	8415-4C	
47/48	Z	7433-4C	
		8415-4C	A 6 1 K 43/ 00
		9051-4C	49/ 02
			A D U B
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 18 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願平6-504662  
(86) (22)出願日 平成5年(1993)7月21日  
(85)翻訳文提出日 平成7年(1995)1月20日  
(86)国際出願番号 P C T / U S 9 3 / 0 6 8 4 8  
(87)国際公開番号 W O 9 4 / 0 2 0 6 8  
(87)国際公開日 平成6年(1994)2月3日  
(31)優先権主張番号 9 1 7 , 7 0 7  
(32)優先日 1992年7月21日  
(33)優先権主張国 米国 (U S)

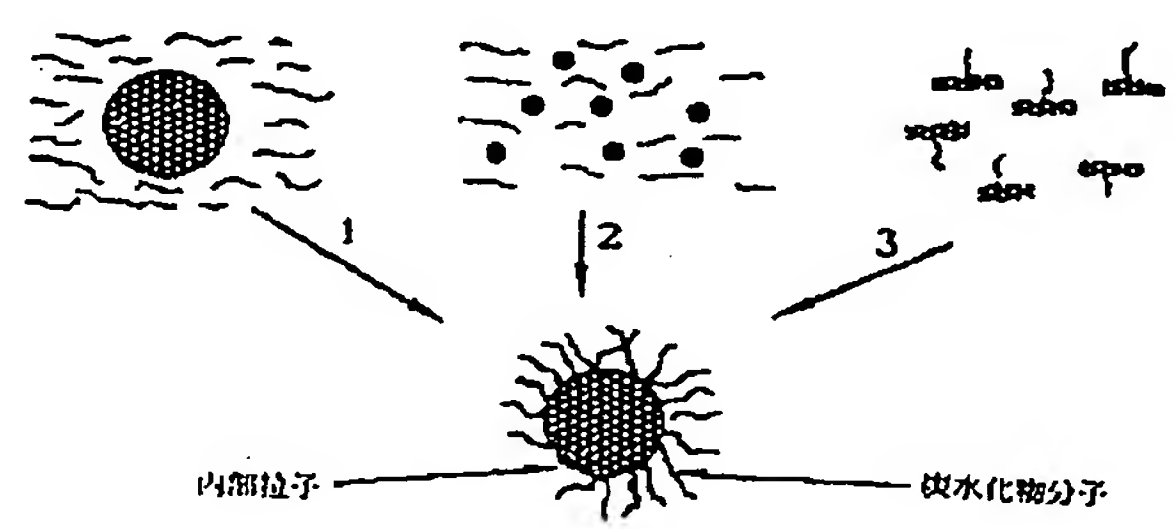
(71)出願人 ザ ゼネラル ホスピタル コーポレーション  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ  
ストン フルーツ ストリート 55  
(72)発明者 バビゾフ ミカーイル アイ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ  
ストン #15 ハウソーン プレイス 9  
(72)発明者 ブラディ トーマス ジェイ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ウ  
ィンチェスター ローソン ロード 10  
(74)代理人 弁理士 吉田 研二 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リンパ組織への薬物輸送システム

(57)【要約】

動物の診断または治療のための物質。物質は、検出可能かまたは治療上活性がある剤を含み、剤がターゲット指向部位に連結されている担体に連結されており、それによって剤がターゲット指向部位が存在しない場合よりも、より大きな度合い動物のリンパ系に蓄積する。



請求の範囲

1. 物質が検出可能かまたは生物活性のある剤を含む、前記剤がターゲット指向部位に連結されている担体に連結されているか、または当該担体内部に保持されており、それによって前記剤が、前記ターゲット指向部位が存在しない場合よりも、より大きな割合で動物のリンパ系に蓄積する、  
動物の診断または治療のための物質。
2. 前記物質の径が100nm以下である、請求項1記載の診断または治療物質。
3. 前記物質の水和した径が10から30nmである、請求項1記載の診断または治療物質。
4. 前記担体がポリマーを含む、請求項1記載の診断または治療物質。
5. 前記ポリマーが線状である、請求項4記載の診断または治療物質。
6. 前記ポリマーが非線状である、請求項4記載の診断または治療物質。
7. 前記ポリマーがポリペプチド、多糖類およびそれらの共重合体の群から選択される、請求項4記載の診断または治療物質。
8. 前記ポリマーがポリリシンおよびポリリシン共重合体の群から選択される、請求項4記載の診断または治療物質。
9. 前記ポリマーがシリコンまたはリンを含む、請求項4記載の診断または治療物質。
10. 前記ターゲット指向部位がC3または自然に存在するC3の変異型または
20. 前記官能基がハロゲンである、請求項14記載の診断または治療物質。
21. 前記官能基がキレートかまたはキレート誘導体である、請求項14記載の診断または治療物質。
22. 前記官能基がN-オキシスクシンイミドエステルである、請求項14記載の診断または治療物質。
23. 前記担体が粒子を含む、請求項1記載の診断または治療物質。
24. 前記粒子が前記粒子を前記剤に連結するための官能基を含む、請求項23記載の診断または治療物質。
25. 前記粒子が有機の粒子、無機の粒子、およびそれらの組成物の群から選択される、請求項23記載の診断または治療物質。
26. 前記粒子がラテックスを含む、請求項23記載の診断または治療物質。
27. 前記粒子が鉄を含む、請求項23記載の診断または治療物質。
28. 前記物質を1mMクエン酸ナトリウムを含むラット血漿に37℃で2時間さらす場合、前記物質が前記物質の1粒子につき1分子以下のトランスフェリンに結合するように前記ターゲット指向部位が前記物質に分布されている、多数のターゲット指向部位をさらに含む、請求項27記載の診断または治療物質。
29. 0.9%NaCl水溶液中の前記物質の0.01-1.0mg/mlの混合物が、前記物質を前記溶液に加えた後、25℃でインキュベートした場合、インキュベーションの初めの24時間中に凝集または沈殿しない、請求項27記載

特表平7-509467(2)

断片に結合できる、請求項1記載の診断または治療物質。

11. 前記ターゲット指向部位が炭水化物を含む、請求項1記載の診断または治療物質。
12. 前記炭水化物がデキストラン、デンプン、 $\beta$ -グルカン、グルコース、フィコール（スクロースの合成ポリマーの商標名）、およびそれらの誘導体および類似体の群から選択される、請求項11記載の診断または治療物質。
13. 前記炭水化物が分子量1から20kDを有する、請求項11記載の診断または治療物質。
14. 前記ポリマーが前記担体を前記剤に連結するための官能基を含む、請求項4記載の診断または治療物質。
15. 前記官能基がアミノ基かまたはアミノ酸誘導体である、請求項14記載の診断または治療物質。
16. 前記官能基がカルボキシル基かまたはカルボキシル基誘導体である、請求項14記載の診断または治療物質。
17. 前記官能基がカルボニル基かまたはカルボニル誘導体である、請求項14記載の診断または治療物質。
18. 前記官能基がチオール基かまたはチオール誘導体である、請求項14記載の診断または治療物質。
19. 前記官能基が芳香族基かまたは芳香族誘導体である、請求項14記載の診断または治療物質。
30. 0.9%NaCl水溶液中の前記物質の0.01-1.0mg/mlの混合物が、前記物質を前記溶液に加えた後、均一の磁場0.47テスラで37℃でインキュベートした場合、インキュベーションの初めの72時間中に凝集または沈殿しない、請求項27記載の診断または治療物質。
31. 前記粒子がシリコンを含む、請求項23記載の診断または治療物質。
32. 前記粒子が放射性同位元素を含む、請求項23記載の診断または治療物質。
33. 前記放射性同位元素がインジウム、テクネチウム、ヨウ素およびガリウムの群から選択される、請求項32記載の診断または治療物質。
34. 前記剤が磁性標識を含む、請求項1記載の診断または治療物質。
35. 前記磁性標識が常磁性または超常磁性標識を含む、請求項34記載の診断または治療物質。
36. 前記磁性標識が鉄、酸化鉄、フェライト、ガドリニウム、マンガン、およびジスプロシウムの群から選択される、請求項34記載の診断または治療物質。
37. 前記剤が核磁気共鳴特性を有する安定な同位元素を含む、請求項1記載の診断または治療物質。
38. 前記同位元素がリン、シリコン、およびナトリウムの群から選択される、請求項37記載の診断または治療物質。
39. 前記剤が生物活性のある成分を含む、請求項1記載の診断または治療物質。

### 特表平7-509467 (3)

40. 前記生物活性のある成分が放射性同位元素を含む、請求項39記載の診断または治療物質。

41. 前記放射性同位元素がアルファまたはベータ線放射体である、請求項40記載の診断または治療物質。

42. 前記放射性同位元素がI、B1、およびAuの群から選択される、請求項40記載の診断または治療物質。

43. 前記剤が超常磁性酸化鉄を含む、請求項1記載の診断または治療物質。

44. 前記剤がペプチドを含む、請求項1記載の診断または治療物質。

45. 前記担体の径が100nm以下である、請求項1記載の診断または治療物質。

46. 前記担体の前記水和した径が10-30nmである、請求項1記載の診断または治療物質。

47. 前記物質を前記動物に前記動物の1kgの体重に付き1mgの用量で経管内注射する場合、リンパ節組織の1gに付き前記物質の注射された用量の少なくとも5%がリンパ節に蓄積するように前記ターゲット指向部位が前記担体に分布されている多くのターゲット指向部位をさらに含む、請求項1記載の診断または治療物質。

48. 前記物質を1mMクエン酸ナトリウムを含むラットの血液の血漿に37℃で2時間さらす場合、前記物質に吸収されるタンパク質の80%以上がC3か、または自然に存在するその変異型であるように、前記ターゲット指向部位が前記物

58. 物質がターゲット指向部位を含む担体を含む、それによって前記担体が前記ターゲット指向部位が存在しない場合よりも、より大きな炭水化物動物のリンパ系に蓄積する、動物の診断または治療のための物質。

59. 前記物質の径が100nm以下である、請求項58記載の診断または治療物質。

60. 前記物質の水和した径が10から30nmである、請求項58記載の診断または治療物質。

61. 前記物質を前記動物に前記動物の1kgの体重に付き1mgの用量で経管内注射する場合、リンパ節組織の1gに付き前記物質の注射された用量の少なくとも5%がリンパ節に蓄積するように前記ターゲット指向部位が前記担体に分布されている多くのターゲット指向部位をさらに含む、請求項58記載の物質。

62. 前記物質を1mMクエン酸ナトリウムを含むラット血液の血漿に37℃で2時間さらす場合、前記物質に吸収されるタンパク質の80%以上がC3か、または自然に存在するその変異型であるように、前記ターゲット指向部位が前記物質に分布されている多数のターゲット指向部位をさらに含む、請求項58記載の物質。

63. 1mMクエン酸ナトリウムを含むラットの血液に37℃で2時間さらされる場合、前記物質が血液の血漿タンパク質においてその重量の50%以下を吸収するように、前記ターゲット指向部位が前記物質に分布されている多数のターゲット指向部位をさらに含む、請求項58記載の物質。

64. 前記物質を1mMクエン酸ナトリウムを含むラットの血液に37℃で2時間さらす場合、前記物質に吸収されるタンパク質の80%以上がC3か、または

質に分布されている多数のターゲット指向部位をさらに含む、請求項1記載の診断または治療物質。

49. 1mMクエン酸ナトリウムを含むラットの血液に37℃で2時間さらされる場合、前記物質が血液の血漿タンパク質においてその重量の50%以下を吸収するように、前記ターゲット指向部位が前記物質に分布されている多数のターゲット指向部位をさらに含む、請求項1記載の診断または治療物質。

50. 前記物質を1mMクエン酸ナトリウムを含むラットの血液に37℃で2時間さらす場合、前記物質に吸収されるタンパク質の80%以上がC3か、または自然に存在するその変異型であり、前記物質が血液の血漿タンパク質においてその重量の50%以下を吸収するように、前記ターゲット指向部位が前記物質に分布されている多数のターゲット指向部位をさらに含む、請求項1記載の物質。

51. ターゲット指向部位を含む担体および剤を供給し、前記剤を前記担体に連結させることを含む、診断または治療物質を調製する方法。

52. 前記担体がポリマーである、請求項51記載の方法。

53. 前記担体が粒子である、請求項51記載の方法。

54. 前記剤が放射性化合物である、請求項51記載の方法。

55. 前記剤が造影剤である、請求項51記載の方法。

56. 前記剤が有機の分子である、請求項51記載の方法。

57. 請求項1記載の診断または治療物質および薬学上許容される化合物を含む、薬剤組成物。

自然に存在するその変異型であり、前記物質が血液の血漿タンパク質においてその重量の50%以下を吸収するように、前記ターゲット指向部位が前記物質に分布されている多数のターゲット指向部位をさらに含む、請求項58記載の物質。

## リンパ組織への薬物輸送システム

本発明は、関心のある領域（たとえばリンパ系）へ診断剤および治療剤を輸送するための診断物質または治療物質に関する。

## 発明の背景

リンパ組織が大部分の病態の過程に関係していることはよく知られている。それらは、周囲の組織における重要な障害にさえも非常に応答性があり、疾患の敏感な指標を代表する。リンパ節の状態は、検出と正確なリンパ節の病期分類が治療の成功に重要である転移病のような重篤な疾患の場合に特に重要である。多くの場合において、組織病理学がリンパ節評価の最も正確な方法であるが、このアプローチは手術的処置を必要とし、局所の解剖部位に限定されている。医療画像法における現在の技術はリンパ節の腫瘍関与を評価するためにサイズ基準をしばしば用いる。しかしながら、正常のサイズの節が癌を含むことがあり、一方肥大した節が癌を含まないことがあるのでサイズは不完全な指標である。したがって、リンパ節構造および機能の詳細を選択的に強調する診断的調製物は、主要な最新の診断方法、たとえば、核医学、磁気共鳴画像およびX線コンピュータ断層撮影の感度および特異性の両方を改善し得る。同時に、治療の効率は損傷を受けた組織における薬物の局所への集中を増大することにより顕著に改善され得る。ヒトの体はリンパ節の数が多く、そしてそれらの大部分への接近が困難なので、単一の脈管内注射の後、全てのリンパ節に到達する剤が好ましい。

リンパ系の構造は、リンパ管を通して間隙に局在化される調製物の排出により、リンパ節への薬物輸送を可能にする。この経路は末梢リンパ節のリンパ管造影法および画像化に採用され、最近、デキストラン分子またはコロイド状の炭素粒子に固定された抗癌剤のような治療調製物の投与が示唆されている。

以前、炭水化物およびそれらの誘導体を含む調製物は、局所投与（間隙またはリンパ内）によりリンパ節へ輸送されていた。リンパ系に局所投与された調製物

の作用は、調製物の型に依存する。たとえば、コロイドはリンパ節細胞によりリンパからしばしば摂取されるが、いくつかのポリマーの調製物（たとえばデキストラン）は顕著な摂取なしにリンパ節を介してリンパ節を通り抜ける。脈管内投与の後、多くの従来の調製物の大部分のフラクションはリンパ組織よりもむしろ肝臓および脾臓により摂取される。ポリマーの調製物はリンパ系による、いくらかの摂取を示すが、リンパ節組織におけるそれらの蓄積の不足は、それらをターゲット指向の診断または治療物質としてあまり望ましくないものになっている。したがって、これらの調製物は、生物の容易に接近し易い表面領域に位置するリンパ節の調査には有用なようであるが、接近しにくい領域に位置するリンパ節には有用ではないようである。

脈管内投与の後のリンパ組織における顕著な蓄積が存在しないにもかかわらず、以前の調製物はリンパ節調査のための生物学的モデルに用いられた。金属ボロフィリンがリンパ節への放射性核種の輸送に用いられているが、リンパ節へ輸送される同位元素の総量は通常約1%を上回らなかった。以前の調製物である極小の酸化鉄粒子の小フラクション（組織1グラムに付き用量の約3、6%）が脈管内注射後、リンパ組織に現われたが、これらの粒子の大部分は肝臓と脾臓に見出されることがWeissleder, R. の "Ultra-small Supermagnetic Iron Oxide: Pharmacokinetics and Toxicity" American Journal of Radiology, 1989, Vol. 152, pp. 167-73にも示されている。粒子の最小量だけがリンパ節および他の組織に検出可能だった。酸化鉄粒子は米国特許第4,770,183号および第4,827,945号に記載されているように画像法における磁気共鳴に用いられ、そしてリンパ節組織を含む、組織の対照画像を製作するために用いられる。高分子の薬物複合体が非経口性の診断および治療の調製物の原型として詳細に研究されている。それらは、通常、担体（たとえばポリマー分子、小胞および微少粒子）とそれに付着した、または組み込まれた剤分子から成る。担体の役割は剤の生体分布を変え、望ましいターゲット組織における剤の濃度を増大させ、非ターゲット部位における剤の濃度を減少させ、それによって、副作用を抑制することである。ターゲット部位におけ

る薬物複合体の蓄積を提供するために、ターゲット組織に対して高親和性を有する分子は、担体の成分としてしばしば使用される。抗体またはそれらの断片およびレセプターリガンド（たとえば、ホルモンまたはそれらの類似体）はターゲット指向薬物に用いられる高親和性分子の通常の例である。

薬物動態学の概念として薬物のターゲット指向は、通常、剤が担体の薬物動態または生体分布に著しい影響を与えてはならないという仮定に基づいている。しかしながら、いくつかの剤は血漿または細胞表面成分と相互作用可能であり、担体の生体分布と薬物複合体の生体分布の間に顕著な差異を生じる。

薬物複合体がターゲット組織に蓄積された場合、剤の作用は担体とのその付着または組み込みの方法に依存する。

リンパ節において、脈管内投与物質の少数のフラクションの出現が種々のポリマーおよびコロイドの群（たとえばポリビニルアルコール、低デキストラン、デキストラン、リボソーム）について報告されている。これらの物質はマクロファージまたは肥満細胞以外のリンパ節細胞にはまれにしか見出されず、リンパ節によるそれらの摂取は極かであった。類似の細胞が肝臓、脾臓、骨髄、腎臓および他の器官においてこれらの物質の摂取を引き受けている。

## 発明の要約

一般に、本発明は、検出可能または生物学的に（たとえば治療上）活性である剤（剤がターゲット指向部位に含まれるか、または連結している担体に連結されているかまたは担体内に含まれ、それによって、剤がターゲット指向部位が存在しない場合よりも、より大きな度合いで動物のリンパ系、たとえばリンパ節に蓄積する）を含む、動物、たとえば魚、爬虫類または哺乳動物、たとえばげっ歯類、たとえばマウスまたはラット、またはウサギまたはヒトの診断または治療のための物質を特徴とする。

好ましい実施態様において、物質、分子または粒子の径は100nm以下である。さらに好ましくは、物質の径（たとえば水和した径）が10-30nmである。

好ましい実施態様において、担体はポリマー（たとえば、直線状または非直線

状ポリマー）を含み、ポリマーはポリペプチド、多糖およびそれらの共重合体の群から選択される。ポリマーは、ポリリシン、たとえばポリリシン共重合体を含む。ポリマーは、ポリグリコシル化合成ポリマーまたは天然のポリマーを含む。ポリマーはシリコンまたはリンまたは両方を含む。

好ましい実施態様において、ターゲット指向部位はC3または自然に存在するC3の要約またはC3の断片に結合でき、たとえばターゲット指向部位はポリビニルアルコール、グリセロール、および炭素含有分子（たとえば、システイン）を含む。

好ましい実施態様において、ターゲット指向部位は炭水化物を含む。

好ましい実施態様において、炭水化物分子は、デキストラン、デンプン、β-グルカン、グルコース、フィコル（スクロースの合成ポリマーの商標名）およびそれらの誘導体および類似体の群から選択され、炭水化物は分子量1-20キロダルトン(kD)を有する。

好ましい実施態様において、ポリマーは担体を剤に連結させる官能基を含む。官能基はアミノ基を含む。官能基はアミノ基誘導体を含む。官能基はカルボキシル基を含む。官能基はカルボキシル基誘導体を含む。官能基はカルボニル基を含む。官能基はカルボニル基誘導体を含む。官能基はチオール基を含む。官能基はチオール基誘導体を含む。官能基は芳香族を含む。官能基は芳香族誘導体を含む。官能基はハロゲンを含む。官能基はキレートを含む。官能基はキレート誘導体を含む。官能基はN-オキシスクシンイミドエステルを含む。

好ましい実施態様において、担体は粒子を含む。担体は粒子の凝集体を含む。担体はコロイドを含む。担体はコロイド状粒子を含む。粒子は粒子を剤に連結する官能基を含む。粒子は有機の粒子を含む。粒子は無機粒子を含む。粒子は有機の粒子の組成物を含む。粒子は無機粒子の組成物を含む。粒子はラテックスを含む。粒子は炭を含む。粒子は酸化鉄を含む。粒子はシリコンを含む。粒子は放射性同位元素、たとえば、インジウム、テクネチウム、ヨウ素、ガリウムのうちのどれかを含む。そして粒子は、剤より成る。

好ましい実施態様において、剤は磁性標識、たとえば常磁性または超常磁性標識を含む。磁性標識は鉄、たとえば酸化鉄またはフェライト、ガドリニウム、マ



## 特表平7-509467 (5)

ンガンおよびジスプロシウムの群から選択される。剤は安定な同位元素、たとえば、核磁気共鳴の特性を有する、リン、シリコンおよびナトリウム、の群から選択される同位元素を含む。剤は、生物活性のある成分、たとえば放射性同位元素、たとえばアルファまたはベータ線放射体、たとえば $^1$ 、 $^3$ 、および $^4$ の群から選択された放射性同位元素を含む。剤は超常磁性の酸化鉄を含む。剤はペプチド、たとえば酵素を含む。剤は毒素、ホルモン、阻害剤、および抗腫瘍剤または抗癌剤である。

好ましい実施態様において、担体の径は100nm以下である。さらに好ましくは、担体の径、たとえば水和した径は、10~30nmである。

好ましい実施態様において、診断または治療の物質は、物質を動物（たとえばラットまたはウサギ）に動物の1kgの体重につき1mgの用量で脈管内に注射する場合、リンパ節組織の1gにつき物質の注射された用量の少なくとも5%がリンパ節に蓄積するように、ターゲット指向部位が担体に分布されている、多数のターゲット指向部位を含む。

好ましい実施態様において、診断または治療の物質は、物質を1mMのクエン酸ナトリウムを含むラット血液の血漿に37℃で2時間さらす場合、物質に吸収されるタンパク質の80%以上が、C3かまたは自然に存在するその変異型であるように、ターゲット指向部位が物質に分布されている、多数のターゲット指向部位を含む。

好ましい実施態様において、診断または治療の物質は、1mMのクエン酸ナトリウムを含むラットの血漿に37℃で2時間さらす場合、物質が、血液の血漿タンパク質において、その重量の50%以下を吸収するように、ターゲット指向部位が物質に分布されている、多数のターゲット指向部位を含む。

好ましい実施態様において、診断または治療の物質は、物質を1mMのクエン酸ナトリウムを含むラットの血漿に37℃で2時間さらす場合、物質に吸収されるタンパク質の80%以上が、C3かまたは自然に存在するその変異型であり、物質が血液の血漿タンパク質において、その重量の50%以下を吸収するように前記ターゲット指向部位が物質に分布されている、多数のターゲット指向部位を含む。

物質を動物に投与、たとえば注射、たとえば、脈管内注射することを含む。

好ましい実施態様において、物質の剤は、化学療法剤、過温症用の剤、放射線療法剤、酵素療法剤、免疫療法剤の群から選択される。

他の態様において、本発明は、本発明の診断または治療の物質を供給すること、動物に診断または治療の物質を投与すること、および診断または治療の物質の分布を決定するために動物を画像化することを含む磁気共鳴画像を得る方法を含む。

好ましい実施態様において、画像化は診断または治療の物質を投与した後1、2、7、15、30、37、または45日、またはそれ以上の日後、行われる。

他の態様において、本発明は、本発明の診断または治療の物質を供給しそして、診断または治療の物質を動物に投与、たとえば脈管内に注射、することによって剤を、たとえば動物、たとえば魚、爬虫類、または哺乳動物、たとえばげっ歯類、たとえばラットまたはマウス、またはウサギ、またはヒトのリンパ系、たとえばリンパ節へ輸送する方法を含む。

他の態様において、本発明は、本発明の診断または治療の物質を供給し上記診断または治療の物質を動物に投与、たとえば脈管内に注射することを含む、動物、たとえば魚、爬虫類または哺乳動物、たとえばげっ歯類、たとえばラットまたはマウス、またはウサギ、またはヒトにおける炎症部位に剤を輸送する方法を含む。

他の態様において、本発明は、本発明の診断または治療の物質を供給すること、診断または治療の物質を動物に投与、たとえば脈管内に注射すること、そして診断または治療の物質の分布を測定するかまたは検出することを含む、動物、たとえば魚、爬虫類、または哺乳動物、たとえば、げっ歯類、たとえばラットまたはマウス、またはウサギ、またはヒトにおける炎症部位を同定する方法を含む。

他の態様において、本発明は、動物の診断または治療のための物質（たとえば担体）を特徴とし、物質がターゲット指向部位を含む担体を含み、それによって、ターゲット指向部位が存在しない場合よりも、担体がより大きな成合い動物のリンパ組織に蓄積する。

好ましい実施態様において、物質は、物質を前記動物に動物の1kgの体重につき1mgの用量で脈管注射する場合、リンパ節組織の1gにつき前記物質の注

射された用量の少なくとも5%が少なくともひとつのリンパ節に蓄積するようにターゲット指向部位が担体に分布されている、多数のターゲット指向部位を含む。物質は、物質を1mMのクエン酸ナトリウムを含むラットの血漿に37℃で2時間さらす場合、物質が、前記物質の1分子につき1分子以下のトランスフェリンに結合するようにターゲット指向部位が物質に分布されている多数のターゲット指向部位を含む。0.9%NaCl水溶液中の物質の0.01~1.0mg/mlの混合物は物質を溶液に加えた後、25℃でインキュベートした場合、インキュベーションの初めの24時間中には凝集または沈殿しない。0.9%NaCl水溶液中の物質の0.01~1.0mg/mlの混合物は、物質を前記溶液に加えた後、均一の磁場0.47テスラで37℃でインキュベートした場合、インキュベーションの初めの72時間中には凝集または沈殿しない。

他の態様において、本発明は、ターゲット部位（たとえば炭水化物）を含む担体を供給し、剤を担体と連結し、剤をターゲット指向部位と連結することを含む、診断または治療の物質を調製する方法を特徴とする。

好ましい実施態様において、担体はポリマーかまたは粒子である。剤は放射性化合物かまたは造影剤である。有機の分子は担体に連結されている。

他の態様において、本発明は、本発明の診断または治療の物質を含む薬剤組成物および薬学上許容される化合物（たとえば賦形剤）を特徴とする。

他の態様において、本発明は、本発明の診断または治療の物質を供給し、動物、たとえば爬虫類または哺乳動物、たとえばげっ歯類、たとえばマウスまたはラット、またはウサギまたはヒトに診断または治療の物質を投与、たとえば注射、たとえば脈管内注射し、そして動物における診断または治療の物質の分布を測定または検出することから成る、組織または臓器、または器官系、たとえばリンパ系、たとえばリンパ節を研究、たとえば画像化する方法を特徴とする。

好ましい実施態様において、分布の測定または検出はガンマシンチグラフィ、フォトンエミッション断層撮影法、磁気共鳴断層撮影法、磁気測定法、磁気測定画像法により行われる。

他の態様において、本発明はリンパ系の障害または疾患を有する動物、たとえば魚、爬虫類、哺乳動物、たとえばげっ歯類、たとえばマウスまたはラット、またはウサギ、またはヒトを治療する方法を特徴とし、本発明の診断または治療の

射された用量の少なくとも5%が少なくともひとつのリンパ節に蓄積するようにターゲット指向部位が担体に分布されている、多数のターゲット指向部位を含む。物質は、物質を1mMのクエン酸ナトリウムを含むラット血液の血漿に37℃で2時間さらす場合、物質に吸収されるタンパク質の80%以上がC3か、または自然に存在するその変異型であるようにターゲット指向部位が物質に分布されている、多数のターゲット指向部位を含む。物質は、1mMのクエン酸ナトリウムを含むラットの血漿に37℃で2時間さらす場合、物質が血液の血漿タンパク質において、その重量の50%以下を吸収するようにターゲット指向部位が物質に分布されている、多数のターゲット指向部位を含む。物質は、物質を1mMのクエン酸ナトリウムを含むラットの血漿に37℃で2時間さらす場合、物質に吸収されるタンパク質の80%以上がC3か、または自然に存在するその変異型であり、物質が血液の血漿タンパク質において、その重量の50%以下を吸収するようにターゲット指向部位が物質に分布されている、多数のターゲット指向部位を含む。

用語“担体”は、組み込み可能な、たとえば剤に連結可能かまたは剤を含むかまたは保持可能な高分子、たとえばポリマーまたはコロイド状粒子を意味し、ターゲット指向部位を含むかまたはそれに連結できる。

用語“炭水化物”は、(A)炭水化物、すなわち、式 $[C(H_2O)]_m$ により表わされる物質であり、mが2以上であり、1単位以上の $[C(H_2O)]$ を含む化合物であり、(B)それらの誘導体、たとえばデキストラン、すなわち、炭水化物（たとえば、単糖類、オリゴ糖類、多糖類）の1以上の任意の官能基、原子、または結合に関わる酸化、還元、置換、脱離、加水分解、重合、縮合、転位、または他の反応により生成され得る物質、そして天然の化合物、化学変化した化合物および完全な合成化合物、加水分解、重合、縮合、転位、または他の反応により生成され得る物質、そして(C)(A)または(B)群の化合物の基または断片、たとえば、水酸基、グリコール基、ヘミアセタール基または上記の基の組み合わせを含む(A)または(B)群の化合物の断片を意味する。

用語“グラフト”は、共有結合、非共有結合の会合、または共有結合および非共有結合の結合を意味する。

## 特表平7-509467 (6)

用語“コア”はターゲット指向部位または部位 (site) を除外した担体の内部 (たとえば、分子、粒子、ミクロスフェア、マイクロカプセル、小胞またはそれらの組み合わせ) を意味する。

用語“炭水化物グラフト担体”は、ターゲット指向部位を形成する炭水化物分子に連結した、たとえばグラフトした、コアを含む任意の担体を意味する。

用語“剤”は、投与可能な剤、たとえば、診断の剤 (すなわち、診断方法に有用な物質、たとえば放射性核種、磁性物質、強磁性物質および超磁性物質) および生物活性のある剤、たとえば、治療の剤を意味する。

用語“保護された担体”は、担体が投与される動物の細胞またはタンパク質との相互作用からグラフト炭水化物分子により、それへ運搬される、コアと剤を (たとえば、空間的に) 保護している担体を意味する。

用語“ターゲット指向部位”は、炭水化物を含みおよび/またはC3 (補体の第3の成分) または自然に存在するC3の断片または変異型に結合できる担体上の部位を意味する。

用語“生物活性”は、生物系に影響を及ぼすことができる物質を意味し、たとえば、治療剤および無機化合物、有機化合物を含む。

ターゲット指向部位、好ましくは多数のターゲット指向部位、たとえばC3と相互作用できる外側の炭水化物構造または他の構造を含む高分子およびコロイド状複合体は、リンパ組織への脈管内投与された複合体の効率的な送達を可能にすることが見出されている。理論に縛られるのではないが、本発明の、たとえば炭水化物グラフト (たとえばデキストラングラフト) ポリマーおよびコロイド状粒子のターゲット指向部位は肝臓、および骨髄における認識を避けるが、リンパ節において容易に摂取されるようである。この作用は効果的な移送過程を可能にし、リンパ節への局在性脈管内投与調製物を生じる。

リンパ節において担体蓄積を引き受けると信じられている炭水化物は、それら自体リンパ節組織に対して親和性を有さず、それら自体脈管内投与の後、リンパ節に顕著な症を蓄積するかもしれないし、蓄積しないかもしれない。しかしながら、それらはリンパ組織において担体の蓄積を引き受けている担体のターゲット指向部位を形成できる。理論に縛られるのではないが、恐らくC3または自然に

存在するその断片またはC3の変異型との炭水化物の相互作用は、本発明の診断および治療物質の生体分布において望ましい役割を果たしているであろう。したがって、C3および発生するC3の断片または変異型と相互作用可能な、たとえば結合または会合可能な炭水化物以外の物質は、本発明のターゲット指向部分として使用される。したがって、この発明において用いられるアプローチは、高親和性分子を用いる輸送によりターゲットとされる、通常に用いられる輸送システムとは異なる。

この発明の剤の担体はリンパ組織への脈管内投与複合体の効率的なターゲット指向輸送を可能にする炭水化物分子 (ターゲット部位を形成する) によりグラフトされている。炭水化物グラフトされた剤の担体は、好ましくは保護 (たとえば空間的に) された複合体においてリンパ組織へ広範囲の診断および/または治療剤の到達のために設計されている。

担体の内部は診断および/または治療剤を担持する分子またはコロイド状粒子の構造を含む。その運動機能に加えて、ターゲット指向部位は、血液中の細胞表面タンパク質およびオプソニン作用タンパク質との相互作用に対して担体の内部を保護する。

本発明の診断の物質または生物活性のある物質または治療の物質は、担体に剤をグラフト、たとえば連結または組み込むことにより形成される高分子、たとえばポリマー、または微粒子の複合体および組成物を含む。したがって、本発明の診断の物質および生物活性のある物質または治療の物質は、リンパ組織の診断または/および治療のために脈管内投与の後リンパ節へ剤を輸送できる。

本発明は、リンパ系疾患および障害 (たとえば癌のリンパ転移、リンパ腫、リンパ節過形成等) の診断、治療および予防のために、上記診断の鑑別のために、リンパ系の構造および機能の研究のために、免疫調節または免疫化のために、そして生化学的監視のために有用である。

本発明は、診断剤および生物活性のある剤または治療剤のリンパ組織への輸送のためにそれらを好適にする生物学的特性を示す可溶性ポリマーまたはコロイド状の複合体 (組成物) の脈管内投与に基づく、診断物質および生物活性のある物質または治療物質を提供する。本発明は、脈管内投与の後、リンパ組織、主にマ

クロファージの存在する領域に蓄積するポリマーおよびコロイド状の剤の担体、およびリンパ組織、特にリンパ節への診断剤および生物活性のある剤または治療剤の *in vivo* 送達のためのこれら担体の使用を含む。

本発明の他の特徴および利点は下記の好ましい実施態様および特許の請求の記載から明らかであろう。

### 詳細な説明

図面を初めに簡単に説明する。この特許の出願はカラーで仕上げられた少なくとも1枚の写真を含んでいる。カラー写真を有するこの特許のコピーは要領と必要経費の支払いにより、特許商標庁により提供される。

### 図面

図1a-1bは、好ましい炭水化物グラフト担体の構造の2つの組織図。

図2は、ポリマーを主成分とする、炭水化物グラフト担体を調製するための3つの基本的方法の図である。

図3は、粒子を主成分とする、炭水化物グラフト担体を調製するための3つの基本的方法の図である。

図4a-4cは、実施例2に従い調製された調製物を用いて、ラットおよびウサギにおけるシンチグラフィ画像の写真である。

図5aおよび5bは、実施例8 (ポリマー) および13 (粒子) に従い調製された放射性標識調製物の24時間の生体分布のグラフである。

図6は、実施例5に従い調製された調製物の局所注射 (左の画像)、静脈注射 (中央と右の画像) の24時間後、ラットのγ画像の比較写真である。

図7は、実施例7に従い調製されたリンパ節組織における蛍光調製物の微小分布の写真 (拡大: 80x) である。

図8aおよび8bは、実施例13に従い調製されリンパ節切開の37日前に投与された粒子を主成分とする調製物 (図8a参照) と、実施例7に従い調製され切開の24時間前に同じ動物に投与されたポリマーを主成分とする調製物 (図8b参照) のリンパ節組織の同じ領域の比較配置の図 (拡大: 400x) である。

図9aおよび9bは、実施例8に従い調製されたインジウム標識、ローゼンX添加の調製物の静脈注射24時間後、ラットの全身シンチグラム、それぞれ正面および側面の写真である。そして

図10aおよび10bは、実施例8に従い調製された調製物の投与24時間後、それぞれ、研究された炎症 (ウサギ) と腫瘍 (ラット) を有する動物のγ画像の写真である。

### リンパ組織

脈管内投与の後、血液中を循環している高分子のフラクションは内皮を通して間隙空間に徐々に侵入する。間隙空間に保持されない場合、血漿タンパク質では自然に起こるように、高分子はリンパ系により排出され一連のリンパ節を通して血流に戻される。

脂質高分子およびコロイド状粒子は主に肝臓、脾臓および骨髄の食細胞により通常摂取される。この過程はオプソニン作用 (すなわち、ポリマー分子または粒子の血漿タンパク質との結合) により、しばしば介在される。多くの可溶性ポリマーおよびコロイドは、これらの臓器により筋力から迅速に (すなわち数分以内) 取り除かれる。局所の間隙投与の後、同じポリマーおよびコロイドは、食作用によるそれらの摂取の結果としてリンパ節に蓄積することに注目すべきである。過程は肝臓、脾臓およびその他の臓器のマクロファージによる摂取に類似している。恐らく、肝臓、脾臓および他の臓器における食作用により生じる急速な血液のクリアランスは、これらのポリマーおよび粒子が脈管内注射後間隙空間に到達するための十分な時間を与えない。対照的に、局所的または脈管内投与の後、蓄積せずにリンパ節を通過するポリマー (たとえばデキストラン) は、肝臓、脾臓およびリンパ節において顕著な摂取なしに長い時間、血中をしばしば循環している。

リンパ組織は、皮質 (たとえば、小胞を含む主にBリンパ球の存在する領域)、皮質傍 (たとえば、主にTリンパ球の存在する領域)、およびマクロファージの存在する領域によりしばしば囲まれているリンパ節を含む、明確な構造的構成要素から成る。リンパ節の構造的構成は疾患により変えられ、転移過程において癌細胞により部分的または完全に置換される。したがって、上記構成要素のひと



つに選択的に蓄積する診断剤は、機能が蓄積の効能に影響するので、リンパ節構造と機能の両方を研究するために有用である。

#### 臓管内投与によるリンパ組織への剤の輸送

診断用の生物活性のある物質または治療物質を基盤とする剤の輸送システムは (1) ターゲット領域に到達する剤の量を最大にし、(2) 非ターゲット領域における剤の濃度を最小にし、そして (3) 剤が剤の効果的な作用のために十分な時間活性状態でターゲット領域に維持または放出されるのを可能にする。診断物質および生物活性のある物質または治療物質は、好ましくは合併症および有害作用を起こさず、生体適合性で、特に生体分解性である。

本発明の診断物質および生物活性のある物質または治療物質は、臓管内投与によりリンパ組織に剤の効果的な輸送を提供する。

本発明の診断物質および生物活性のある物質または治療物質は、リンパ組織への診断剤および生物活性のある剤、または治療を輸送するためにそれらを好適にする、生物学的特性を示す可溶性のポリマーまたはコロイド複合体および組成物の使用に基づいている。剤と担体の複合体は (臓管内投与の後) リンパ組織に蓄積し、その結果、診断剤および生物活性のある剤または、生物活性のある剤、たとえば治療剤を蓄積部位、特にリンパ節に輸送する。

この発明の高分子およびコロイドの剤の複合体は共通の構造的構成要素を有する複製物の族を形成する。剤複合体の共通の構成要素は外部の炭水化物を含む担体と剤である。担体はポリマーかまたは粒子である。剤は診断または生物活性のある、たとえば治療剤であり、そして担体の内部コアに連結している。

#### 担体

本発明の担体は、*in vivo* で剤を運搬するための構造を提供する内部コア、およびターゲット指向部位から成り、ターゲット指向部位は炭水化物の他の部分を含み、C3または自然に存在するC3の断片または変異型に結合でき、*in vivo* で複合体の目的的位置への運搬を可能にする。

好ましくは、炭水化物分子は外側の分子との相互作用に対してコアおよび剤を

空間的に保護し、その結果、血漿タンパク質および細胞によるコアおよび剤の認識を最小にする。炭水化物分子は凝集構造を形成し、その結果小さな分子の複合体内部への付加を可能にする。凝集性炭水化物層は、小さな分子さえも通過しない稠密な層により置換されるか、またはそれと結合する。

担体の内部は、診断剤および生物活性のある剤または治療剤を担持するために設計された分子またはコロイド粒子の構造を含む。炭水化物により提供される空間的保護により、コアの内容物および構造は *in vivo* での薬物複合体の分布に影響を与えない。したがって、炭水化物がコアに連結、たとえばグラフトして、その結果ターゲット指向部位を形成し、かつ炭水化物グラフトコアの総サイズが下記の限界を超えないならば、剤を包み込み可能などんなコアもこの発明の診断物質および生物活性のある物質または治療物質中に使用される。ポリマー分子およびコロイド状粒子は、この発明の好ましいコア構造を代表する (図1aおよび1b参照)。図1aはポリマーを主成分とする可溶性複合体 (すなわち、コアはポリマー分子である) を示す。図1bはコロイド状複合体 (すなわちコアは粒子である) を示す。両者において、炭水化物分子が複合体を空間的に保護する。

本発明の担体は臓管内投与からリンパ節まで通るように設計されている。複合体のサイズが移動過程に重要なので、担体の全直径は100nm以下である。担体適合性を決定する検査は、気孔の径0.1μmを有するフィルターにより担体含有培養物の濾過により行う。担体の好ましい径、たとえば、水和した径は、レーザー光散乱、ゲルクロマトグラフィーまたは限外濾過 (透析) により測定され10-30nmである。本発明の診断剤および生物活性のある剤または治療剤は、本発明の担体の径を著しく増大させてはならないので、診断および、治療物質の全径は約100nm以下である。好ましくは、径、たとえば水和した径は10-30nmの範囲である。

担体の (例えばリポソームおよびポリマー) の剤放出速度は、本発明の好ましい担体を同定するために以前研究された。担体の構造は、剤の結合および/または放出のためのさらに別の官能基、たとえばキレート [たとえばジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA)] スペーサー基および分解性 (たとえば、加水分解可能、酸化可能、還元可能) 結合を含む。

で容易に置換され得る。

ポリマー材料およびコロイド材料の公定の定義にはっきりした明確な相違はない。交差結合したポリマー構築物はコロイドまたは複合体ポリマー分子として分類される。

この発明の診断物質および生物活性のある物質または治療物質のためのコアとしてコロイド状粒子の実行可能性を示すために、無膜のコアを有する粒子を主成分とする担体を調製した (実施例11-14参照)。粒子を主成分とする担体の内部コアは、金属水酸化物または酸化物粒子 (たとえば、水酸化インジウム、常磁性酸化物鉄 (III) および超常磁性酸化物鉄) から成っていた。常磁性酸化物鉄 (III) および超常磁性酸化物鉄 (III) は放射性核種 (たとえば  $^{111}\text{In}$ ) の担体として用いられる。

#### 炭水化物

完全合成ポリマーを含む炭水化物ならびにそれらの誘導体および類似体は、血漿タンパク質および細胞レセプターによる、それらの認識に対応して4つの群に分けられる。

群 (1) は、細胞レセプターより直接そして特異的に認識される物質、たとえば、ガラクトースの残基を含む化合物、N-アセチルグルコサミンおよび特定の細胞レセプターの他のリガンドから成る。

群 (2) は、血中に存在する免疫グロブリンにより特異的に結合される抗原性化合物に代表される。血漿レクチンのリガンド、たとえばマンノース結合タンパク質 (MBP) のリガンドはまた特異的に結合され、したがって群 (2) に属する。

群 (3) は、補体3 (C3) 成分だけにより非特異的に認識される炭水化物から成り、水酸基を含む共有結合化合物または他の親水性の基に結合し、C3のチオエステル部位と反応できる。他の群の炭水化物もC3により認識されるが、他の型の相互作用がそれらの生物学的作用より優る。

群 (4) は非特異的相互作用 (たとえば、複数の水素結合、静電的相互作用、ファンデルワールス相互作用および疎水性相互作用) により多くの血漿タンパク

#### ポリマー (可溶性) 担体

ポリマーは剤を保持するためのそれらの大きな収容力と多くの種類の剤を保持するそれらの能力により剤の担体として、しばしば用いられる。多くのポリマーは生体分解可能であり、それらの生体分解および代謝の産物は毒性のほとんどない、または毒性のないことを示している。炭水化物の連結および剤を可能にする官能基、たとえばアミノ基、カルボキシル基、およびカルボニル基、組み込みを特徴とするポリマーは、この発明のコア成分として好ましい (たとえば、*in vivo* で分解性の化学結合 (たとえば、ポリマーの主鎖におけるペプチド結合、ヘミアセタールまたは酢酸結合およびエステル結合) を有するポリマー)。適切なポリマーは、ポリペプチド、多糖類、ポリエステルおよびポリアミドを含む。

たとえば、ポリリシンは、コア形成に好適な特に好ましいポリマーである (実施例1-8参照)。ポリリシンを主成分とするポリマー担体の内部コアは、単一のポリリシン分子、分枝したポリリシン、またはデキストラン分子をコアの構造的成分として用い、外側のターゲット指向部位の一部として用いない。内部のデキストラン分子およびポリリシン分子により形成される分子の "骨格" (実施例9および10参照) を含む。これらのモデルコアは、たとえば実施例3-8に記載されているように改変され、診断剤および生物活性のある剤または治療剤も充填される。

#### 粒子を主成分 (コロイド状) とする担体

粒子を主成分とする担体において、コロイド粒子は、細胞および血漿タンパク質との相互作用に対してコロイド状粒子の表面を空間的に保護する炭水化物 (たとえば、デキストラン) の稠密な層によりグラフトされることが好ましい。粒子を主成分とする担体は、2つの理由によりこの発明の好ましい担体の群として含まれる。第一に、いくつかのコロイド状粒子は効果的な診断 (たとえば、超常磁性NMR造影剤) および治療剤 (たとえば、局部の過温症のための強磁性剤) であることが知られている。第二に、親油性の剤は、コロイド状親油性の粒子コア

質および細胞表面タンパク質に結合している炭水化物を含む。細胞表面および血漿タンパク質の特性は依然として完全に確証されていないので(R<sub>h</sub>認識因子の軽い成分とのMBPの同一性という最近の発見により明らかにされたように)群4のいくつかの構成物は、実際には群1または2に属し得る。いかなるメカニズムによってもin vivoで認識されない炭水化物の存在は証明されていない。

炭水化物は剤の担体の成分として用いられるが、運搬分子としては通常用いられない。レセプターによる認識可能な物質を含む群1の炭水化物は、レセプターへのターゲット指向剤の運搬成分として研究された。群2のどの構成物の臓管内投与も、通常、肝臓および脾臓における調製物の蓄積を生じ、迅速な免疫応答を引き起こす。これらの理由により、それらはワクチンの成分として主に用いられ、臓管内の運搬材料としてそれらを使用することは好ましくない。群4の炭水化物は、それらの多様性を考慮すると、共通の生物学的特性を有しない。しかしながら、特徴決定されていない生物学的特性を有する群4の物質の使用は望ましくないことは明白である。群3の多糖類は血中で長い循環時間を有し、レセプター系との関係において中性であることが知られている(たとえば、デキストラン)。多糖類は便利な生体適合支持分子、そして効果的なコロイドの安定剤として用いられるが、特に、ポリマーまたはコロイド状の薬物担体の運搬材料としては用いられない。

群3の炭水化物は本発明に使用できる。群1、2および4の炭水化物はあまり好ましくない。

炭水化物の炭水化物の適合性は、炭水化物がリンパ系への本発明の診断物質および生物活性のある物質または治療物質の選択的なターゲット指向を生じるかどうかを判定することにより評価できる。たとえば、炭水化物は、実施例2の方法に類似の方法により調製された診断物質または治療物質に組み込まれ、実施例5に従い標識され、実施例16に示すように動物(たとえばラット)に投与される。本発明における使用に好適な炭水化物はラットに体重1mg/1kgの用量で投与された場合、少なくともひとつのリンパ節にリンパ節組織1グラムに付き注射された用量の5%以上、好ましくは10%以上の(診断物質および生物活性のある物質)の蓄積を示す。

この発明の担体の可能な成分と構造的詳細の多様性を考慮して、我々はこの発明の担体の生物学的特性のために重要な構造的成分に焦点を当て、担体の合成の一般的方法をここに提供する。いくつかの担体の合成の詳細は実施例に示されている。

ポリマーを主成分とする担体および粒子を主成分とする担体を合成する好ましい方法は、あるコアに関して、連結される炭水化物の数とサイズが(1)コアの確実な空間的保護を可能にし、そして(2)適切な担体サイズおよび剤の分子に対して担体の十分な収容量を提供するのを最適にするという必要条件に焦点を当てている。

さらに、MRIT<sub>1</sub>剤の好ましいポリマーを主成分とする担体の第3の必要条件は、炭水化物層が担体中のT<sub>1</sub>剤の場所への水分子の拡散を可能にすることである。

したがって、炭水化物分子の数とサイズが空間的保護の程度と直接関係しているにもかかわらず、炭水化物でコアを過剰負荷することは、それが剤の結合に使用できるコアの間隙を制約するので望ましくない。この矛盾を克服するために、分岐したポリマーコアまたはラックスを線状のコア分子の代わりに用いる。

#### ポリマーを主成分とする(可溶性)担体の合成

本発明のポリマーを主成分とする担体は、好ましくは、次の3方法により調製される。

- (1) 炭水化物をポリマー分子に連結、たとえばグラフトする。
- (2) 炭水化物含有の可溶性生成物(たとえばモノマー)を共重合する。そして
- (3) 固体のポリマーの重合材料またはゲルを分解する(図3参照)。3方法は類似の生成物を生じる複数の段階を含む。

この発明の例は、ポリマーコアへ炭水化物分子の無作為グラフトに基づいている。なぜなら、それは実験室規模の合成に最も便利な方法だからである。炭水化物分子は、たとえばコアポリマーの選択された官能基に炭水化物を付着させるためにオリゴ糖の末端基を用いて、たとえば1点修飾により付着される。異質な合成ペプチド(すなわち1以上のアミノ酸から成る)と1点修飾を用いること

この発明の好ましい炭水化物(たとえばデキストラン)はレセプター認識可能な部位、血液レクチン認識可能な部位および高抗原性部位を含んではならない。また、炭水化物はC<sub>3</sub>成分(担体の第3成分)以外の細胞壁および血漿タンパク質に対し非特異的に結合してはならない。ターゲット指向部位の炭水化物分子は、リンパ節における炭水化物グラフト担体の蓄積を引き受けるが、それらはそれら自体、臓管内投与の後、リンパ節に顕著な蓄積することもあるし、しないこともある。

理論により導かれるのではないが、この発明の炭水化物グラフト(たとえばデキストラングラフト)ポリマーおよびコロイド状粒子は肝臓および脾臓における迅速な認識を避けるが、リンパ節の食作用のある細胞により容易に摂取される。この作用により、効果的な移動過程が可能になり、リンパ節における臓管内投与された調製物の局在化を生じる。

炭水化物分子、特にオリゴ糖類および多糖類およびそれらの類似体は、空間的保護を提供すると信じられている。なぜなら、それらは発明のコアおよび剤との細胞表面タンパク質の大きな分子および成分の相互作用および吸着を防ぐからである。内部コアの空間的保護は、多くの数の長いポリマー状炭水化物または類似分子を担体にグラフトする場合、最も効果的である。しかしながら、担体の総サイズを最適な範囲内(すなわち100nm以下、好ましくは水の緩衝において10-30nm)に維持するために炭水化物の長さおよび数は限定される。さらに、小さな炭水化物分子を用いる場合、担体の収容力(担体物質の量当たりの剤の量)は大きい。これらの前提条件を考慮すると、1-20kDのサイズの範囲のオリゴマーの炭水化物およびポリマーの炭水化物が好ましい。

好ましい炭水化物分子の例は、デキストランおよびその合成類似体、デンプンおよびその誘導体、ポリグリコシル化合成ポリマーおよび天然ポリマーを含む。他の炭水化物、それらの誘導体および他のC<sub>3</sub>結合分子もまた本発明の担体の成分として用いられる。さらに、2以上の異なる炭水化物を同じ担体に付着させ、その生体分布を改善させる。

#### 担体の合成

により、薬剤用調製物の望ましい構造が得られる。

実施例は、剤がコアポリマーに炭水化物分子の付着前または後に付着できることを示している。選択的な反応を用いる場合、反応の結果は実質的に同じである。しかしながら、望ましくない副産物が形成されることもある。たとえば、炭水化物(たとえばデキストラン)の後、担体コア(たとえばポリヒリシン)へのDTFPA酸化無水物の付着は、エステル結合の形成によりデキストラン分子へのDTFPAの結合を生じる。

生化学的従来方法、たとえば特殊なスパーサー分子を用いて担体への剤の結合(たとえばコアポリマー分子へのスパーサー分子の付着)も用いることができる。担体の生体分解性を改善するために、容易に分解できる化学結合を担体構造に導入できる。スパーサー分子は分解可能な結合も含み、したがって担体からの制御された剤の放出のシステムを提供する。

#### 粒子を主成分(コロイド状)とする担体の合成

この発明の粒子を主成分とする担体は、好ましくは、次の3方法により調製される。1) 炭水化物を微粒子に連結、たとえばグラフトする。2) 炭水化物の存在下でコロイド状粒子を形成する(たとえば、無機粒子に関して)。そして3) 炭水化物含有可溶性生成物からコロイド状粒子を形成する(図3参照)。第1の方法は、有機の粒子を主成分とする担体の調製に好ましい。第2の方法は無機の粒子を主成分とする担体を調製するために好ましい。第3の方法はミセルおよび小粒形成に好ましい。

粒子を主成分とする担体を合成する好ましい方法は、グラフトされる炭水化物分子の数を最大にすることに焦点を当てる。粒子を主成分とする担体において、空間的保護の質は特に重要である。なぜなら、コロイド状粒子は多くの血液タンパク質を容易に吸収し、迅速な血液クリアランスと肝臓および脾臓における粒子の蓄積を生じるからである。

炭水化物安定化(たとえばデキストラン安定化)コロイド形成のいくつかの方法が知られているが、それらの大部分は、それらの安定剤により粒子の確実な保護を提供しない。本発明者は、合成の成功は粒子形成の調製方法だけでなく、反



前条件のいくつかの詳細にも依存していることを見出した。たとえば、デキストランの存在下で酸化鉄を沈殿させることにより、超常磁性デキストラン固布コロイドの公表された方法は、リンパ組織へのこれらの粒子の顕著な送達を提供しない。しかしながら、高濃度のデキストラン、低濃度の鉄塩の存在下で、そして異なる温度下での合成（実施例13参照）は、炭水化物グラフトしたポリマーのそれに類似の生体分布を有する固着なデキストラングラフト粒子の形成を提供する。

#### リンパ組織への炭水化物グラフト固体の輸送 固体の生体運動学および生体分布

静脈投与後の炭水化物グラフト固体の生体運動学がラットおよびウサギにおける（実施例15参照）流動研究によるシンチグラフィおよび多数の静的研究により研究された。第四パラメータはPapilov, M. の "Magnetic Drug Targeting, In Vivo Kinetics of Radiolabelled Magnetic Drug Carriers" [Int. J. of Pharm., 1987, 40: 201-206] に記載され、本出願の参照文献に記入されている不可逆的動機モデルに対応するクリアランス/蓄積率として計算された。

調製物の血液クリアランスは  $20 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 1 \text{mg}/\text{kg}$  の用量範囲内では実質的に単一指散関数であることが見出された。用量  $0.5 \sim 1 \text{mg}/\text{kg}$  での完全無傷なラットにおける半クリアランス時間は、デキストラングラフト酸化鉄（実施例13参照）について2.4時間、デキストラングラフトポリシリシン（実施例2参照）について1.6時間、そしてデキストラングラフトポリシリシンRhX-DTPA（実施例8参照）について2.2時間であることが見出された。

動的シンチグラフィは、リンパ節の腸間膜および大動脈切の群がラットにおいて注射2-4時間後、ウサギにおいて注射7-10時間後認識可能になることを示した。他の節はラットにおいて6-10時間後、そしてウサギにおいて12-24時間後充分な信号/バックグラウンド率を現わした。図4a（前掲図像）はラットリンパ節の腸間膜および大動脈切群が顕著な摂取を示したことを示

す。図4b（前掲図像）は頸部、腋窩、および胸節のリンパ節が、ラットの約50%において図像（胸部）で見えたことを示す。図4bおよび4c（右前方斜めのウサギの頭）は、頸部のリンパ節は発見が少ないがラットとウサギにおいて見えたことを示す。他のリンパ節は顕著な摂取を示したが、それらの大部分はγ照像により目視化された。脾臓の活性が全ての場合において高く、肝臓は放射性標識の濃度が非常に低いことを示した。肝臓、脾臓およびリンパ節の図像は、それらの質量比が約500:40:1であるにもかかわらず、類似の活性信号を示す。他の組織における摂取は、ラットおよびウサギにおけるバックグラウンドに実質的に匹敵すると考えられた。両者は少なくとも96-100時間は顯著に変化せず、再分布の速度の低いことを示唆した。

実施例8および13に従い調製された調製物を用いる他の実験（実施例16参照）において、放射性標識の生体分布を従来法に従いラットで研究した（図5aおよび5b参照）。最大の担体摂取はリンパ節の腸間膜と大動脈切群に見出された（異なる調製物について組織1グラムにつき平均20-50%用量、そして選択された場合において組織1グラムにつき140%までの用量）。他のリンパ節は異なる摂取を示した。他の組織における担体の蓄積は非常に低くであった（0.01-0.2%用量/グラム組織）。実施例16に従うが異なる用量の注射を用いた実験は、生体分布の用量依存性を示している。投与の範囲は体重の1kgにつき担体5μg-50mgであることが見出された。

これらの研究において、我々は、いくつかのリンパ節において組織1gにつき注射された用量の100%以上の蓄積を生じ、リンパ節に静脈投与されたポリマーの有意なフラクション（20%以上）の移動を観察した。炭水化物グラフト調製物の局所注射も、リンパ節への効果的送達を提供した（図6参照）。図6において、左の図像は、この発明の炭水化物グラフト調製物の局所注射から得られ（実施例2参照）、中央および右の図像は、この発明の炭水化物グラフト調製物の静脈注射から得られた。空間的に保護された担体調製物の局所注射は、局所のリンパ節において材料の約90%摂取を示した。

#### リンパ節における担体の微小分布

リンパ節内の調製物の微小分布は、実施例7に従い調製されたフルオレセイン標識およびIn標識の担体の静脈注射24時間後、採取したリンパ節を光学蛍光顕微鏡およびオートラジオグラフィにより調べられた（実施例17参照）。フルオレセインのかわりにローダミンに置換した類似の実験は、類似の結果を提供した。

図7に示すように、リンパ節組織の蛍光顕微鏡およびオートラジオグラフィは、デキストラングラフトのポリシリシンの最も顕著な蓄積がリンパ節の腸間膜に位置する細胞、皮質および皮質下の散在細胞（たとえばマクロファージおよび/または肥満細胞）であることを示した。リンパ節により占拠された領域における蛍光物質の量は顯著ではなかった。

デキストラングラフト酸化鉄粒子の微小分布を、静脈投与24時間後、リンパ節組織の光学顕微鏡およびオートラジオグラフィにより研究した（実施例13参照）。粒子を主成分とする担体の微小分布は、ポリマーを主成分とする担体のそれと類似であることを見出した。本出願で報告した実験のポリマーおよび粒子を主成分とする物質のデータおよび類似の微小分布は、固着な炭水化物グラフト粒子コアが生物系のタンパク質、細胞および他の成分と相互作用せず、または顕著な相互作用せず、したがって粒子の生体分布に顕著な影響を与えないという仮定と一致しない。対照的に、以前示されているように、可逆的に付着した炭水化物分子を有する粒子（したがって、空間的に保護されていない）は肝臓および脾臓により数分で血液から消滅化される（Papilovら、1987, Int. J. Pharm.）。

ひとつの実験において（実施例18参照）、実施例13に従い調製された第一の調製物の配置を、実施例8に従い調製された第一の調製物の37日後に投与された第二の調製物の配置と比較した。この実験において、酸化鉄粒子の調製物を、ローダミンX標識のポリマー調製物を投与する37日前に投与した。ローダミンX標識した調製物の投与24時間後にリンパ節を採取した。組織片を透過光および蛍光性の照で研究した。図8aは酸化鉄粒子の配置を示すリンパ節組織の写真である。図8bは、図8aおよび8bのようにリンパ節組織の同じ領域の蛍光顕微鏡小写真である。図8aに示す鉄蓄積の配置は、実施例13に従い調製されたデキ

ストラングラフト粒子がリンパ節で分解せずに30日以内に代謝されないことを示す。また、鉄はローダミンX標識のポリマー調製物の低発光蓄積の領域から主に離れた領域に蓄積されていた。この実験の詳細については実施例18参照。

#### リンパ組織に輸送される診断物質および生物活性のある物質または治療物質の使用

下記に示すように、この発明の診断物質および生物活性のある物質または治療物質を広範囲の種々の診断剤および治療剤の輸送に用いる。この発明の診断調製物の価値は、リンパ節の食作用のある細胞におけるそれらの選択的蓄積（これがリンパ節の疾患（たとえばリンパ腫）に対して最新の診断方法（たとえば磁気共鳴画像法およびシンチグラフィ）の感度および解像度を増大し得る）に基づいている。リンパ組織は、本発明の担体を長時間（すなわち、数時間または数日間さえも）保持する。長い滞留時間により、リンパ組織の治療のためにこれらの担体の使用（特に、この発明の診断物質および生物活性のある物質、または治療物質を用いて、蓄積の部位に剤を放出する場合）が可能になる。

それらの長い滞留時間および細胞の空間への侵入により、炭水化物グラフト担体は、さらに別のターゲット物質的分子（たとえば、抗体等）の固定にも効果的に用いられ、血液にさらされる他のターゲット組織または臓器への薬物輸送を提供する。

#### 型

この発明の剤は診断剤および生物活性のある剤または治療剤を含む。剤は、コアに、好ましくは化学結合、集合体形成、カプセル化または高分子または微粒子複合体内に剤の滞留を提供する全ての方法により担体のコアに組み込まれる。

単一の担体分子または粒子により運搬される剤の分子数は、剤のサイズにだけ依存し、大きな分子にはひとつ、小さな分子、たとえばキレート基には数百と異なる。

この発明の担体により運搬される剤分子のサイズの上限は担体のサイズそのものに依存し、薬剤複合体の生体分布のための最適なサイズを超えてはならない。

たとえば、比較的それらの大きなサイズのために、タンパク質分子の限られた数だけがこの発明のコア構造を形成し、高分子複合体の最適な径の限界内に残る。生化学的方法における最近の発見は、タンパク質の特異的毒性の著しい減少なしにほとんど全てのタンパク質を組み込んだ担体コアを形成することを可能にしている。

上記を考慮して、炭水化物結合担体により運搬される剤の多様性は、この発明の診断物質または治療物質の広範囲の様々な適用を承認している。診断剤はシンチグラフィおよびフォトンエミッション断層撮影の調剤のための放射性標識（たとえば、インジウム、テクネチウム、ヨウ素、およびガリウム）、磁性標識（たとえば、鉄、ガドリニウム、マンガンおよびジスプロシウム化合物に基づく、たとえば核磁気共鳴画像法のT1およびT2剤）および安定な同位元素（たとえば、NMRスペクトル標識としてリン、シリコン、ナトリウム）を含む。

生物活性のある剤および治療剤は、たとえば、アルファまたはベータ放射線放射性同位元素、無機化合物（たとえば癌の過温症のための剤として硫酸鉄）および有機化合物（たとえば、タンパク質、ペプチド、酵素、毒素、ホルモン、阻害剤、および抗生物質）を含む。炭水化物連結、たとえば、炭水化物グラフトした、抗腫瘍剤または免疫調節物質を充填した化合物をターゲット指向抗転移リンパ親和性薬物として使用できる。実施例7および8に示すように、2つ以上の異なる剤を同時に担体に接続できる。

この発明の診断物質および生物活性のある物質または治療物質のさらに別の例、およびそれらの可能な適用は表1に記載されているものを含む。

表1

適用	充填したもの	目的
診断	ガンマ線放射体	リンパ節シンチグラフィ
	磁性	
	T1剤	リンパ節MRE画像法
	T2剤	リンパ節MRE画像法
	放射線不透過性の剤	リンパ節CTスキャン
	超音波散乱剤	リンパ節超音波検査
治療	ベータまたはアルファ線放射体	LN転移放射線療法
	免疫調節物質	LN転移予防療法
		全身的免疫調節
		活性化マクロファージにより
		感染リンパ球の排除
抗癌剤		LN転移化学療法
抗原		免疫処置

#### 担体の収容力および生体分布

血液からリンパ節に移動させられる炭水化物連結ポリマーの特有の運動動態は、臓管内リンパ親和性の診断物質および治療物質の開発のための剤の担体としてそれらの使用を可能にする。

本発明の担体はそれらの（1）内部コア（たとえばポリリシン）が多量の診断用標識または生物活性のある化合物で充填されているので大きな収容力を有する可能性、そして（2）細々の剤を含み、そして運搬する能力により特徴づけられる。この発明の実施例は広範囲の剤（たとえば、放射性核種、T1（ガドリニウム）およびT2（超常磁性酸化鉄）、NMR造影剤、および有機の分子（DTPA、ローグミンX）を担体の内部コアに結合するか、または担体の内部コアと

して用いる（実施例5、6、7、8、13参照）。

腎臓の部位において、剤の作用は担体へのその付着の方法に依存する。したがって、剤と担体の結合は、効果的な剤の作用を提供するように選択される。診断剤の大部分（たとえば、放射性核種およびNMRおよびX線造影剤）およびいくつかの治療剤（たとえば、酵素）は担体に連結されながら、それらの目的を達成する。しかしながら、大部分の生物活性のある剤または治療剤は担体から放出され、したがってそれらは遊離した、未結合状態で機能する。したがって、担体の化学構造は、それが担体の特性を失うことなく剤と担体の間の異なる化学結合の使用を可能にする場合、最適と考えられる。実施例2および4は、種々の官能基およびスペーサー分子がポリマーコアに組み込まれることを示す。

グラフトした剤を有するこの発明の炭水化物グラフト担体の生体分布は、剤を有さない炭水化物グラフト担体のそれと類似することが期待される。担体の生体分布への剤の影響を推測するために、ローグミンX（RhX：分子量=584D）を有機分子の剤として選択した。多量のRhX分子を担体のポリリシンコアに固定し（実施例8）、治療用高分子複合体の構造を形成した。この調製物の生体分布をシンチグラフィおよび従来方法により研究し、RhXを含まない担体の生体分布と類似していることを示している。表2および図9と9bは生体分布の例を示す。

表2 ローグミンX充填デキストラン連結ポリリシンの生体分布の典型的な例

組織	炭水化物結合 % 重量/g 組織
リンパ節:	
大動脈傍	113.40
腸間膜	34.10
胸部	19.30
線窩	41.30
頸部	2.00
脾臓	20.30
肝臓	1.50
筋肉	0.02

#### 実験的樹型モデルにおける炭水化物グラフト担体の作用

炭水化物グラフト調製物のリンパ節における蓄積は、周囲の組織の状態に依存する。実施例7に従い調製された調製物を用いる実験において（実施例19参照）、採取に及ぼす炎症の作用を研究した。急性炎症は、最も近い局所のリンパ節における調製物採取の増大を生じることが見出された（図10a参照）。この実験において、調製物は炎症の領域にも蓄積することが示された。類似の結果が、右同様に増殖する癌を有するラットの実験において得られた（実施例20および図10b参照）。この実験において、癌領域に排出している節において過温症が組織学的方法により見出された。これは、リンパ節における調製物の蓄積の増大を説明する。

炎症部位における担体蓄積のメカニズムは、リンパ節におけるそれと密接に関

似している。蛍光顕微鏡およびオートラジオグラフィーを用いて、癌の部位での蓄積は、癌組織の中よりもむしろ主に散在細胞（修飾されたマクロファージ）中での摂取によるものであった。炎症部位における腫瘍の透過性の増大も蓄積に寄与している。癌組織1グラムに付き蓄積される放射性物質の量は、正常および過温症のリンパ節組織の1グラムに付き蓄積される量より著しく少なかった。したがって、本発明は、特にリンパ転移の診断、予防および治療、転移およびリンパ節の過温症の鑑別に有用であると予想される。

#### 実施例

##### 実施例1 デキストラングラフトポリリリシンの合成

水5mlにデキストラン (MW 10kD) 2gを溶解し、水1.5mlに過ヨウ素酸ナトリウム0.4gを溶解する。デキストラン溶液と過ヨウ素酸ナトリウム溶液を混合し、室温で1時間または攪拌下4℃で12時間インキュベートする。続いて、反応混合液に200mlになるまで水を加え希釈する。YM3膜を備えた限外濾過アミコンセル (Amicon cell) を用いて、溶液を5mlに濃縮する。希釈と濃縮の段階を繰り返し、反応液の低分子量生成物を取り除く。続いて、ポリリリシン (MW 70kD) 20mgをクエン酸ナトリウム緩衝液 (0.1M, pH 8.3) 2mlに溶解する。濃縮された酸化デキストラン溶液とポリリリシン溶液を激しい攪拌下で混合する。攪拌下で20分間インキュベートする。水素化シアノホウ素ナトリウム20mgを水1mlに溶解し、反応混合液に加える。反応混合液を室温で24時間攪拌する。反応混合液に200mlになるまで水を加えて希釈し、続いて、YM100膜を備えた限外濾過アミコンセルを用いて溶液を5mlまで濃縮する。希釈と濃縮の段階を、合計でそれぞれ3回行う。続いて、生成物を凍結乾燥するか、または0.1Mクエン酸ナトリウム0.1mlを加え、溶液の状態で貯蔵する。

デキストラングラフトポリリリシンを、実施例2-4のように、内部のポリマー（ポリリリシン）のアミノ基へのキレート基または他の基の付着により修飾する。

トール10μlを加え攪拌する。続いて、37℃で1時間インキュベートする。セファデックスG-100または類似のゲルを充填した、10×1cmまたは類似物のゲルクロマトグラフィーカラム、そして溶離液として0.9%NaClを用いて生成物を分離する。-20℃の室温下で貯蔵する。

この固体をSH基含有化合物の直接結合のために、およびスルフィド基と対して高親和性を有する金属イオンの選別のために用いる。

実施例5-9は放射性核種およびT1磁気共鳴造影剤で標識されたポリマー固体である。DTPAキレート化の最適pH範囲と水和イオン ( $^{111}\text{In}^{3+}$  および  $\text{Gd}^{3+}$ ) の安定性の最適pH範囲の不適合性のために、標識化はリガンド交換により行われる。

##### 実施例5 デキストラングラフトポリリリシン [ $^{111}\text{In}$ -DTPA]

0.04M HCl中の  $^{111}\text{InCl}_3$  (1mCi) 溶液を5倍容量の0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液pH 5.3-5.5 (または市販のインジウム-111クエン酸溶液を用いる) と混合する。実施例2のようにポリリリシン [DTPA] デキストラン100μgを0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液0.1ml, pH 5.3-5.5に溶解する。溶液を混合し、室温で30分間インキュベートする。インキュベーション後、必要ならば、 $\text{CaCl}_2$  1mgを加えて残存しているDTPA基を不活性化させる。標識物をゲルクロマトグラフィー（セファデックスG-25、溶離液として0.5%NaCl）により0.9%NaClと置換する。

##### 実施例6 デキストラングラフトポリリリシン [ $\text{Gd}$ -DTPA]

0.2Mクエン酸ナトリウム緩衝液pH 5.3-5.5中に10mg/mlの  $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  溶液を調製する。実施例2のように、ポリリリシン [DTPA] デキストラン10mgを水0.1mlに溶解する。 $\text{GdCl}_3$  クエン酸ナトリウム2mlとポリリリシン溶液を混合し、室温で30分間インキュベートする。標識物をゲルクロマトグラフィー（セファデックスG-25、溶離液として0.9%NaCl）により0.9%NaClと置換する。

##### 実施例2 デキストラングラフトポリエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) 修飾ポリリリシンの合成

実施例1からのデキストラングラフトポリリリシン1mgを0.1Mホウ酸ナトリウム0.1mlに溶解し、溶液を氷浴で冷却する。DTPA酸化無水物5mgをジメチルスルホキシド (DMSO) 0.1mlに溶解する。DTPA酸化無水物溶液を4℃のデキストラングラフトポリリリシン溶液に加え、激しく攪拌する。続いて、4℃で12時間インキュベートする。セファデックスG-100または類似のゲルを充填した、10×1cmまたは類似物のゲルクロマトグラフィーカラム、そして溶離液として0.9%NaClを用いて、生成物を分離する。生成物を凍結乾燥するかまたは溶液の状態で貯蔵する。

##### 実施例3 デキストラングラフト [N-ヒドロキシスクシンイミド・ビス・ジチオプロピオン] ポリリリシンの合成

実施例1からのデキストラングラフトポリリリシン1mgおよびトリエチルアミン0.01mlをDMSO 0.1mlに溶解する。(ジチオ・ビス・ジプロピオン) N-ヒドロキシスクシンイミド5mgをDMSO 0.1mlに溶解する。(ジチオ・ビス・ジプロピオン) N-ヒドロキシスクシンイミド溶液をデキストラングラフトポリリリシン溶液に加え、激しく攪拌する。続いて、20℃で1時間インキュベートする。セファデックスG-25または類似のゲルを充填した、10×1cmまたは類似物のゲルクロマトグラフィーカラム、そして溶離液としてDMSOを用いて生成物を分離する。生成物を凍結乾燥するかまたは-20℃の凍結液中で貯蔵する。

この固体はアミノ化合物の直接結合のために用いられる。

##### 実施例4 デキストラングラフト [3-メルカプトプロピオン] ポリリリシンの合成

実施例3からのデキストラングラフト [N-ヒドロキシスクシンイミド (ビス・ジチオプロピオン)] ポリリリシン1mgを0.1Mクエン酸ナトリウム溶液0.1mlに溶解する。37℃で1時間インキュベートする。ジチオエリトリ

##### 実施例7 デキストラングラフトポリリリシン [ $\text{Gd}$ , $^{111}\text{In}$ -DTPA] [フルオレセイン]

実施例1のように、ポリリリシンデキストランを調製し、1mgを0.1Mホウ酸ナトリウム (pH 9.3) 1mlに加える。DMSO 100μl中に0.2mgのフルオレセインイソチオシアナート溶液を調製する。フルオレセインイソチオシアナート溶液を激しい攪拌下でポリリリシンデキストラン溶液に注入する。室温で30分間インキュベートする。DTPA酸化無水物5mgをDMSO 0.1mlに溶解する。DTPA酸化無水物溶液をポリリリシン [フルオレセイン] デキストラン溶液に加え、激しく攪拌する。続いて、4℃で12時間インキュベートする。セファデックスG-100または類似のゲルを充填した、10×1cmまたは類似物のゲルクロマトグラフィーカラム、そして溶離液としてDMSOを用いて生成物を分離する。0.04M HCl中の  $^{111}\text{InCl}_3$  (1mCi) 溶液を5倍容量の0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液pH 5.3-5.5 (または市販のインジウム111クエン酸ナトリウム溶液を用いる) と混合する。ポリリリシン [DTPA-フルオレセイン] デキストランと  $^{111}\text{InCl}_3$ -HCl-クエン酸ナトリウム溶液を混合し、室温で30分間インキュベートする。0.2Mクエン酸ナトリウム緩衝液、pH 5.3-5.5中に10mg/mlの  $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  溶液を調製する。 $\text{GdCl}_3$  クエン酸ナトリウム0.2mlを反応混合液に加え、室温で60分間インキュベートする。ゲルクロマトグラフィー（セファデックスG-25、溶離液として0.9%NaCl）により生成物を分離する。

##### 実施例8 ローグミンX (RhX) を充填されキレート基 (DTPA) で標識されたデキストラングラフトポリリリシンの合成

ポリリリシン臭化水素物 (MW 40kD Sigma) 10mgを0.1Mホウ酸ナトリウム (pH 9.3) 1mlに溶解する。DTPA酸化無水物 (Pierce) 4mgをDMSO 50μlに溶解し、冷却した (5℃) ポリリリシン溶液に攪拌下で加える。ローグミンXイソチオシアナート (分子プローブ) 3.



0 mgをDMSO 20  $\mu$ lに溶解し、反応混合液に加える。得られた溶液を室温で2時間インキュベートする。生成物ポリリシン(RhX)(DTPA)をセファデックスG-25(Pharmacia)のゲルクロマトグラフィーにより精製する。

デキストラン1 g(MW 10 kD, Pharmacia)を水5 mlに溶解し、NaIO<sub>4</sub> 溶液2 ml、100 mg/mlのH<sub>2</sub>Oと混合する。1時間のインキュベーションの後、反応混合液に100 mlになるまで水を加えて希釈し、続いて、塩を取り除くためにアミコンYM3膜を用いて5 mlに濃縮する。希釈と濃縮の段階を、それぞれ合計3回行う。

酸化デキストランの溶液をポリリシン[RhX][DTPA]溶液と混合し、続いて、0.1 Mクエン酸ナトリウム(pH 8.3)中の水素化シアノホウ素ナトリウム溶液(1 mg/ml) 50 mlと混合する。反応混合液を室温で24時間攪拌する。アミコンXM50膜を用いてデキストラングラフトポリマーを分離し、ゲルクロマトグラフィー(セファデックスG-100)により精製し、凍結乾燥する。

上記の合成方法はデキストランで創作為にグラフトされるポリマー組成物ポリリシン[RhX][DTPA]を得るために開発された。生成物は、ポリリシン1分子につきデキストラン24分子(平均であり、PLのMW=40 kDおよびデキストランのMW=10 kDと仮定する)4% (w/w)のロードミンX(金イオンの吸着能力0.15  $\mu$ g/mg)を含んでいた。

#### 実施例9 分枝ポリリシンコアポリマー

100 mgのポリ( $\epsilon$ -N-カルボベンゾキシ(CBZ))リシン(MW=10 kD)をDMSO 3 mlに溶解する。クエン酸ナトリウム0.1 mgを加え攪拌する。ジシクロヘキシルカルボジイミド2 mgを加え、攪拌し、10分間インキュベートする。ポリリシン(MW=10 kD)10 mgをDMSO 100  $\mu$ lに溶解し、反応混合液に加える。攪拌下で24時間インキュベートする。沈殿物を遠心により取り除く。生成物を凍結乾燥する。HBr/酢酸試薬5 mlを加え、攪拌する。密閉したチューブ中で1時間インキュベートする。沈殿物を分

非常に激しい攪拌下で、0.04 M HCl中の<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> 溶液50  $\mu$ lを酵母 $\beta$ -グルカンフルオレセイン溶液(0.5 mg/ml) 0.5 mlに注入し、続いて30%アンモニア5 mlを加える。生成物を70℃で30分間インキュベートする。ゲルクロマトグラフィー(セファデックスG-100)として溶離液として0.9% NaClを用いて生成物を分離する。

#### 実施例13 デキストランにより間接にグラフトされた超常磁性酸化鉄粒子

デキストラン(MW 10 kD) 1.55 gを水3 mlに溶解する。溶液を室温で30分間攪拌する。デキストラン溶液中でFeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.105 gとFeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.039 gを溶解し、得られた溶液を4℃まで冷却する。溶液のpHが10.5に増加するまで非常に激しい攪拌下で30%アンモニア溶液を1滴ずつ徐々に加える。続いて、攪拌下で生成物を70℃で45分間インキュベートし、限外濾過(YM300膜)またはゲルクロマトグラフィー(セファローズ CL2Bまたはセファクリル S300)を用いて生成物を分離する。

#### 実施例14 酸化鉄フィコールグラフト粒子

フィコール(スクロースの合成ポリマーの商標名: MW 40 kD) 20 gを水20 mlに溶解し、溶液を室温で30分間攪拌する。フィコールの溶液中にFeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.1 gを溶解し、得られた溶液を4℃まで冷却する。溶液のpHが10-10.5に増加するまで非常に激しい攪拌下で30%アンモニア溶液を1滴ずつ徐々に加える。攪拌下で生成物を70℃で30分間インキュベートする。限外濾過(YM300膜)またはゲルクロマトグラフィー(セファローズ CL2Bまたはセファクリル S300)を用いて生成物を分離する。

上記実施例は、この発明に従い空間的に保護される薬物塩体を調製するための一般的で特定の指針を示すが、当業者は、さらに別の候補分子を組み立て、それらの特徴を本発明により特許請求されている分子と比較できる。

#### 動物実験

離し、ドライエーテル5 mlで少なくとも5回ほど洗浄する。

分枝ポリリシン異化水素は実施例1-8のものと類似の合成におけるコアポリマーとして使用できる。

#### 実施例10 デキストランポリリシン分子“骨格”

デキストラン(MW=10 kD) 1 mgを水0.2 mlに溶解する。過ヨウ酸カリウム0.5 mgを水0.1 mlに溶解し、溶液を混合する。攪拌し、室温で1時間インキュベートする。20 mgのポリリシン(MW=10 kD) 溶液を0.1 Mホウ酸ナトリウム(pH 9.3) 1 ml中で調製する。酸化デキストランとポリリシン溶液を混合する。攪拌下で20分間インキュベートする。3 mgの水素化シアノホウ素ナトリウム溶液を水0.5 ml中で調製し、反応混合液に加える。攪拌し12時間インキュベートする。ゲルクロマトグラフィー(セファデックスG-100)により生成物を精製し、凍結乾燥する。

ポリリシンデキストラン複合体は実施例1-8のものと類似の合成におけるコア“骨格”ポリマーとして使用できる。

#### 実施例11 1 n 標識された(最小合成)酸化鉄III $\beta$ -グルカングラフト粒子

酵母 $\beta$ -グルカン2 mgを水5  $\mu$ lに溶解する。FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 2 mgを水10  $\mu$ lに溶解する。栓を固めた、小さな(1 ml)ポリプロピレン遠心チューブ中で $\beta$ -グルカン溶液とFeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 溶液1  $\mu$ lを混合する。<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> 溶液1 mlを加える。飽和NH<sub>3</sub> 溶液で湿らせたクロマトグラフィー紙の小さな一片を、このチューブの上部に置く(NH<sub>3</sub> 溶液を反応混合液に落とすとはならない。また紙は溶液に接触してはならない。NH<sub>3</sub> をガス相により反応混合液に移動する)。チューブを閉じて70℃の湯槽に30分間入れる。セファデックスG-100または類似のゲルを充填した、10×1 cmまたは類似物のゲルクロマトグラフィーカラム、そして溶離液として0.9% NaClを用いて生成物を分離する。

#### 実施例12 水酸化インジウム $\beta$ -グルカン【フルオレセイン】

#### 実施例15 ラットおよびウサギシンチグラフィ

スプラッグ・ドーレイ(Sprague Dawley)ラット(250-300 g) 22匹およびホワイトニューグランド(white New Zealand)ウサギ(2-2.5 kg) 4匹に動物実験を行った。動物をペントバルビタール(ラット)または塩酸ケタミン(ウサギ)で麻酔した。放射標識したポリマー(実施例1および5にしたがって調製された) 1 mg/kg (0.3-1 mCi/kg) を尾の静脈に注射した。調製物の生体運動学を動的シンチグラフィにより研究した。静的画像を注射24時間後に得た。結果を図4a-4cに示す。

#### 実施例16 ポリマーおよびコロイドデキストラングラフト調製物の生体分布

スプラッグ・ドーレイラット(250-300 g) 16匹に動物実験を行った。動物をペントバルビタールで麻酔した。放射標識したポリマー(実施例8に従い調製)または粒子(実施例13に従い調製) 1 mg/kg (0.1-1 mCi/kg) を尾の静脈に注射した。注射の正確性をシンチグラフィにより管理した。尾の組織に放射能を示す動物は、実験から除外された。動物を犠牲にし、注射24時間後、生体分布の研究のために組織を採取した。結果を図5a(ポリマーを主成分とする)そして5b(粒子を主成分とする)に示す。

#### 実施例17 リンパ節組織における蛍光、放射性核種調製物の最小分布

スプラッグ・ドーレイラット(250-300 g) 6匹に動物実験を行った。動物をペントバルビタールで麻酔した。放射標識した蛍光ポリマー(実施例7に従い調製) 1 mg/kg (0.1 mCi/kg) を尾の静脈に注射した。注射および生体分布の正確性をシンチグラフィにより管理した。動物を犠牲にし、注射24時間後、最小分布の研究のために組織を採取した。リンパ節組織を凍結し、5-7  $\mu$ m切片を固定せずに調製した。蛍光顕微鏡検査はZeiss Axiovert 35顕微鏡を用いて行った。蛍光物質の蓄積は胸腺の領域に位置する細胞(恐らくマクロファージと同定される) また胸腺面を面う細胞に、最も

顯著であった。皮膚側の散乱細胞、小腸周囲の細胞および小腸内マクロファージも顯著な量の蛍光物質を蓄積した。調製物の典型的な微小分布を図7に示す。

#### 実施例18 投与24時間後および37日後の調製物の微小分布比較

動物実験をスプライン・ドレイラット(350g)2匹に行った。動物をペントバルビタールで麻酔した。放射線量の超常磁性酸化鉄粒子、1kgに付き鉄50 $\mu$ m(実施例13に従い調製)を尾の静脈経路で投与し、24時間後、それらの生体分布をシンチグラフィにより管理した。放射線量蛍光ポリマー(実施例8に従い調製)1mg/kg(0.1mCi/kg)を酸化鉄粒子の注射37日後、同じ動物の尾の静脈経路で注射した。注射および生体分布の正確性をシンチグラフィにより管理した。動物を犠牲にし、注射24時間後、微小分布の研究のために組織を採取した。リンパ節組織を凍結し、5-7 $\mu$ m切片を固定せずに調製した。蛍光顕微鏡検査をZeiss Axiovert 35顕微鏡を用いて行った。蛍光物質の蓄積は実施例17に記載されたそれと類似であることが見出された。鉄粒子(正常のラットには存在しない)が臓器と皮膚物の主に網様毛細血管周囲の領域に形成された。蓄積の位置は蛍光標識のものと同様であった。酸化鉄粒子およびローダミンX標識ポリマー調製物の投与後の同じリンパ節領域の蛍光顕微鏡写真および透過光顕微鏡写真(図8a参照)を示す。

#### 実施例19 誘発した炎症を有する動物における炭水化物グラフトポリリシン分布の研究

ホワイトニュージランドウサギ(3-3.2kg)4匹に動物実験を行った。以前記載されているように、細菌 $1 \times 10^8$ を有するスタヒロコッカス・アウレウス懸濁液の注射により足の組織に急性炎症を誘発した。実施例7に従い調製した調製物を、注射後30日に投与した。動物を塩酸ケタミンで麻酔した。放射線量のポリマー1mg/kg(0.3mCi/kg)を耳の静脈に注射した。静的画像を注射48時間後に得た。結果を足の領域の前方画像として図10aに示す。

#### 実施例20 誘発された乳腺癌を有する動物における炭水化物グラフトポリリ

ポリマーは、凍結状態または溶液状態でクエン酸緩衝液組成物と組み合わせで用いる。必要ならば、種々の放射性核種での標識のためにDTPA基を他のキレート基で置換する。

磁気共鳴造影剤を前もって調製し、固体の組成物としてまたは溶液として貯蔵する。いくつかの適用のために、著しく技術を変えることなく異なるT1およびT2の弛緩活性を有する他の常磁性金属イオンによりガドリニウムを置換する。

ターゲット指向の生物活性のある化合物は、上記実施例のものに近い技術を用いて、診断調製物のために調製される。使用される剤がある条件で不安定である場合、医薬調剤の最適化は、特に、生物活性のある剤の貯蔵の必要条件に依存する。一般に、安定性と薬理学的に望ましい(たとえば溶解を促進する)添加剤を有する、凍結乾燥状態の炭水化物連結ポリマーおよび微粒子の生成のための障害はない。

本発明の診断および治療物質は次の性質の1以上を有する。物質を動物(たとえばラットまたはウサギ)に動物の1kgの体重に付き1mgの用量で腹腔内に注射する場合、リンパ節組織の1gに付き物質の注射された用量の少なくとも5%がリンパ節に蓄積するようにターゲット指向部位が担体に分布している。物質を1mMのクエン酸ナトリウムを含むラット血液の血漿に37℃で2時間さらす場合、物質に吸収されるタンパク質の80%以上がC3か、または自然に存在するその変異型であるようにターゲット指向部位が物質に分布している。1mMのクエン酸ナトリウムを含むラットの血液に37℃で2時間さらす場合、物質が血液の血漿タンパク質において、その重量の50%以下を吸収するようにターゲット指向部位が物質に分布している。物質を1mMのクエン酸ナトリウムを含むラットの血液に37℃で2時間さらす場合、物質に吸収されるタンパク質の80%以上がC3か、または自然に存在するその変異型であり、物質が血液の血漿タンパク質において、その重量の50%以下を吸収するように前記ターゲット指向部位が物質に分布している。そして(担体または剤が鉄を含む実施態様において)、物質を1mMのクエン酸ナトリウムを含むラットの血液に37℃で2時間さらす場合、物質が、前記物質の1粒子に付き1分子以下の移動と結合するようにターゲット指向部位が物質に分布している。0.9%NaCl水溶液中の物質の0.

#### シン分布の研究

フィッシャーラット(200-250g)24匹に動物実験を行った。両乳房の乳腺癌を $10^7-10^8$ R3230AC細胞(マサチューセッツ州 Hockinson市 Biomeasureから得た)の皮下移植により誘発した。実施例7に従い調製された調製物を、移植後10日目に投与した。動物をペントバルビタールで麻酔した。放射線量されたポリマー1mg/kg(0.3mCi/kg)を足の静脈に注射した。静的画像を注射24時間後に得た。結果を、頭側の体領域の前方画像として図10bに示す。

#### 実施例21 磁気共鳴測定のための炭水化物グラフト担体の適用

実施例8に従い調製した担体を実施例7に記載しているように $^{111}\text{In}$ で標識し、ガドリニウムを充填した。調製物を、実施例16に記載されているように、1kgの体重に付き15 $\mu$ mのGdの濃度でラット5匹に投与した。腸間膜リンパ節を投与24時間後に採取し、ひとつの試料チューブにプールした。リンパ節の弛緩時間T1を37℃で測定し、逆回置パルス配列を用いて0.47Tであった。腸間膜リンパ節の弛緩時間は、対照群のラット5匹の476msに比較し154msに減少することが見出された。

#### 用法

本発明の物質は、一般に、体重1キログラムに付き2グラム以下の用量で、好ましくは体重1キログラムに付き5マイクログラム-50ミリグラムの用量で投与される。

#### 他の実施態様

他の実施態様は下記の特許の請求の範囲であり、たとえば、担体を基にした調製物は、貯蔵条件のための例外的な必要条件なしに便利な医薬調剤として生成される。

画像のための診断調製物は、注射直前に標識のために調整された非放射性キットとして調剤化されている。したがって、本発明の実施例2に従い調製された

0.1-1.0mg/mlの混合物が、物質を溶液に加えた後、25℃でインキュベートした場合、インキュベーションの初めの24時間中には凝集または沈殿しない。0.9%NaCl水溶液中の物質の0.01-1.0mg/mlの混合物は、物質を前記溶液に加えた後、均一の凝集0.47テスラで37℃でインキュベートした場合、インキュベーションの初めの72時間中には凝集または沈殿しない。

これらの特性は、物質が、たとえば下記のプロトコルを用いる本発明での用途に適切かどうかを決定するために用いられる。フィブリン形成を防ぐために最小量、たとえば1mMのクエン酸ナトリウムを含む完全凝固の正常なラット血液の血漿を調製する。前記血漿中に問題の担体(または物質)を37℃で2時間インキュベートする。前記担体または物質を、たとえば超音心により血漿から分離する。問題の担体または物質へのクンバク質結合と本発明の担体(たとえば実施例2または13に従い調製)のそれとを、たとえば電気泳動およびイムノブロットにより比較する。本発明の担体は、C3および自然に存在するその変異型および断片に主に結合するが、他の担体、たとえば酸化鉄粒子は顯著な量の(たとえば結合したC3に対して10-1500% w/w)トランスフェリン、免疫グロブリンまたは他のタンパク質に結合する。

無機物において(たとえば鉄含有粒子)、トランスフェリンの結合は、診断および生物活性または治療の物質または担体において、さらされて保護されていない粒子表面の存在、または望ましくない種類の金属(たとえば鉄)化合物の存在を示す。本発明の鉄含有物質および担体は、上記条件下で1粒子に付き1トランスフェリン以上結合しない。

免疫グロブリンおよび他のタンパク質の結合は、保護されていない粒子表面のタンパク質の非特異的吸着、ならびに担体または物質構造における(たとえばターゲット指向部位における)望ましくない成分の存在、たとえば物質合成の過程において変化した炭水化物分子の存在を示す。他のタンパク質の存在は、タンパク質の非特異的吸着、または本発明の担体または物質とのタンパク質の非特異的または特異的相互作用を示す。トランスフェリン、免疫グロブリンおよび他のタンパク質の結合は肝臓、脾臓、腎臓および他の領域における担体の認識を増

加させ、リンパ節における腫体の蓄積を減少させる。

これらの方法は、それらの製造業者の物質のパラメーターを最適にするためにも使用される。

我々はこの発明の保護された製剤物の毒性および不妊性に関していかなる重大な問題も予想していない。たとえば、我々のモデル製剤物の合成のために用いられる出発物質は、基本的に生体分解可能であり、それらは滅菌の、非発熱性状態で得られる。さらに、最終の製剤物は滅菌、γ照射およびオートクレーブにより滅菌される。

Figure 1a

Figure 1b

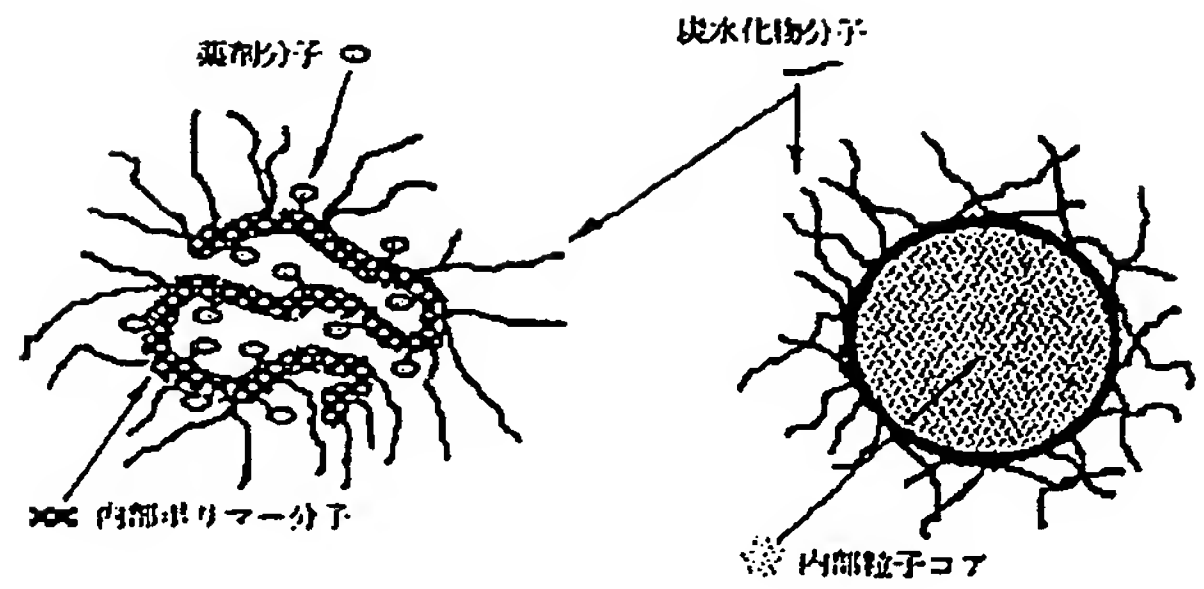


Figure 2

Figure 3

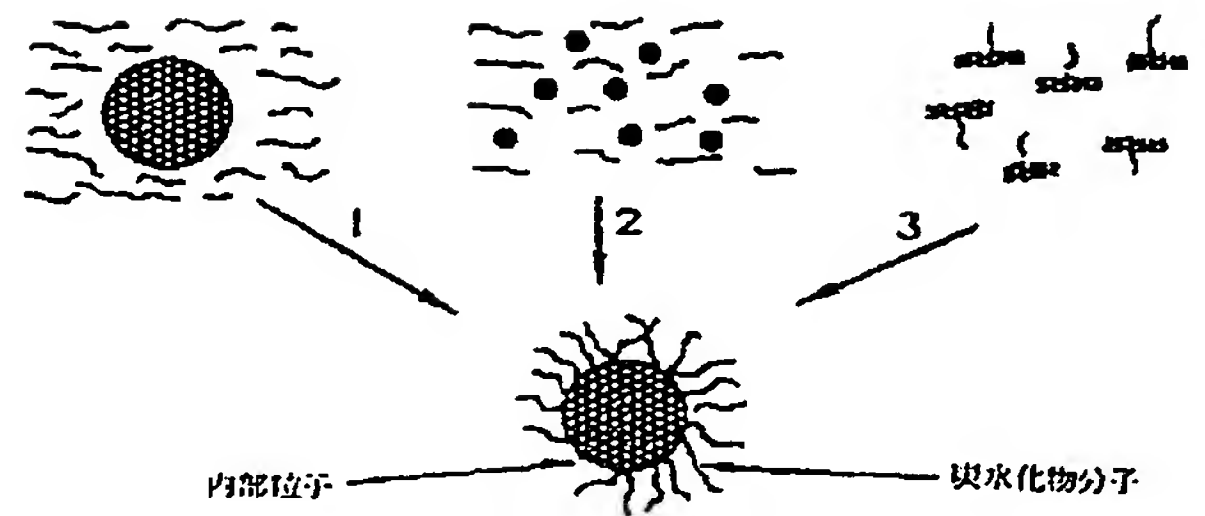
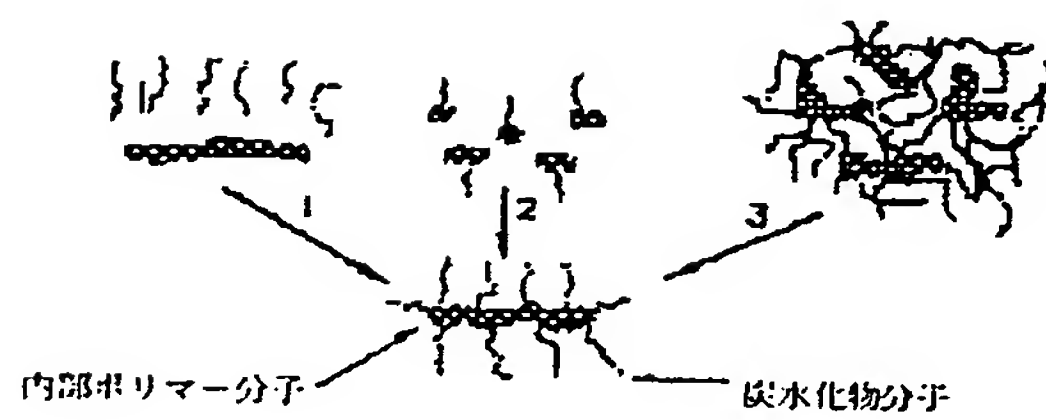




Figure 4a

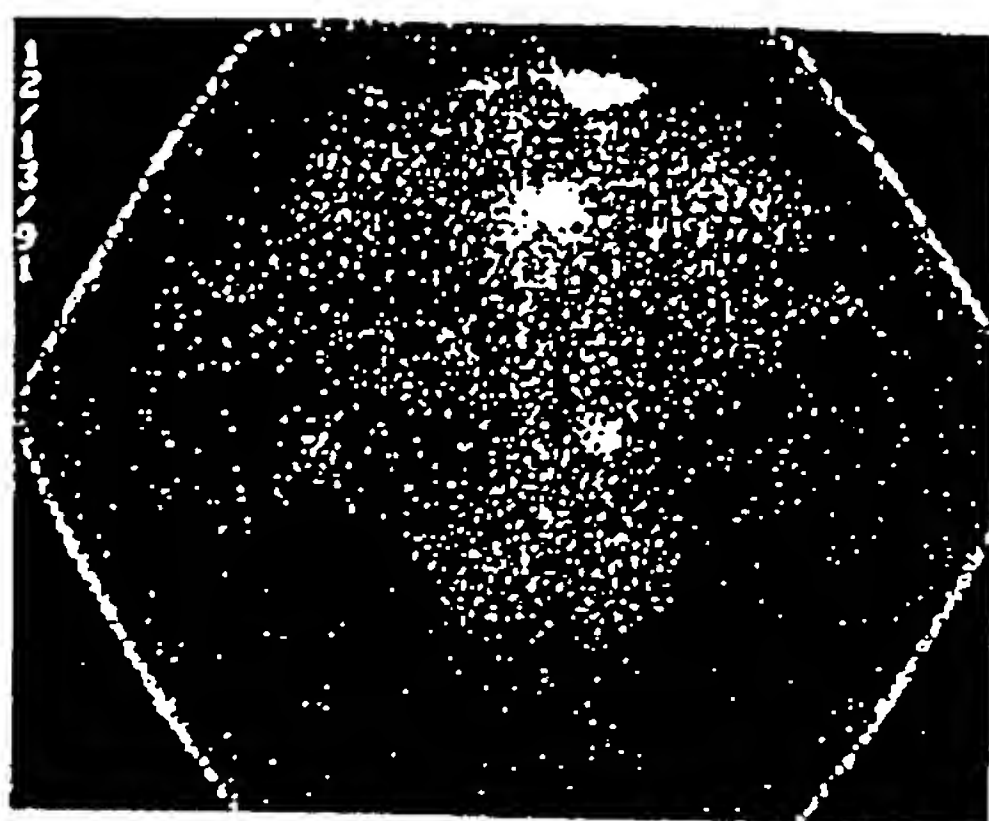


Figure 4b

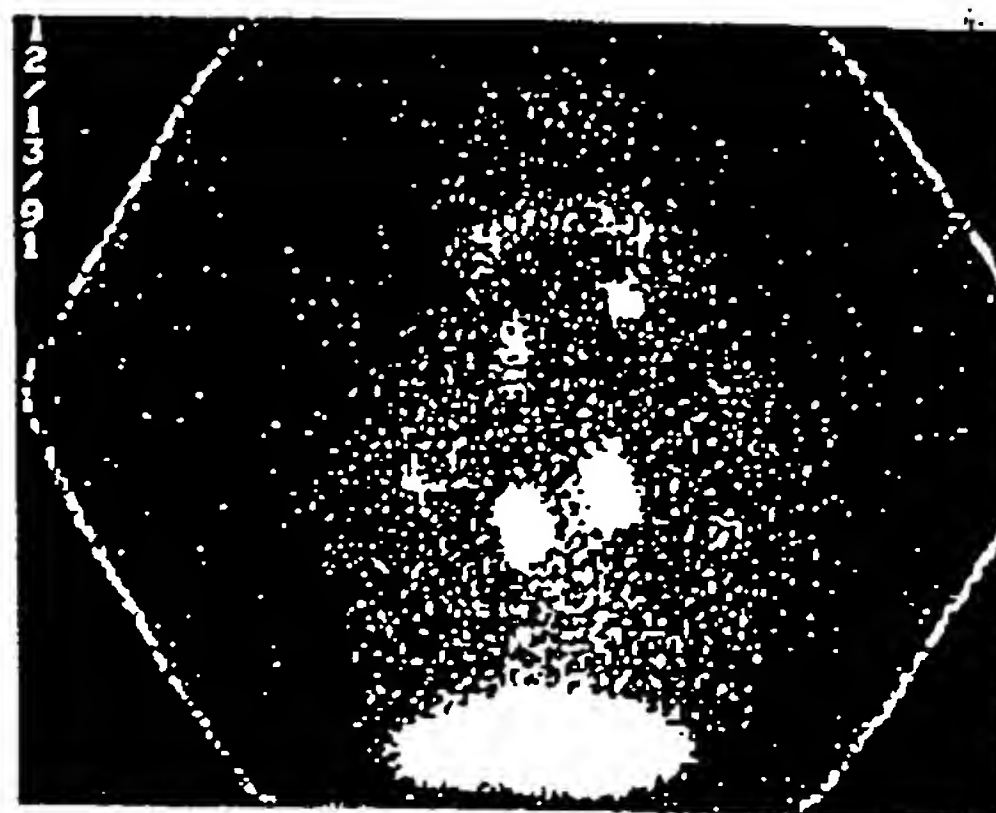


Figure 4c

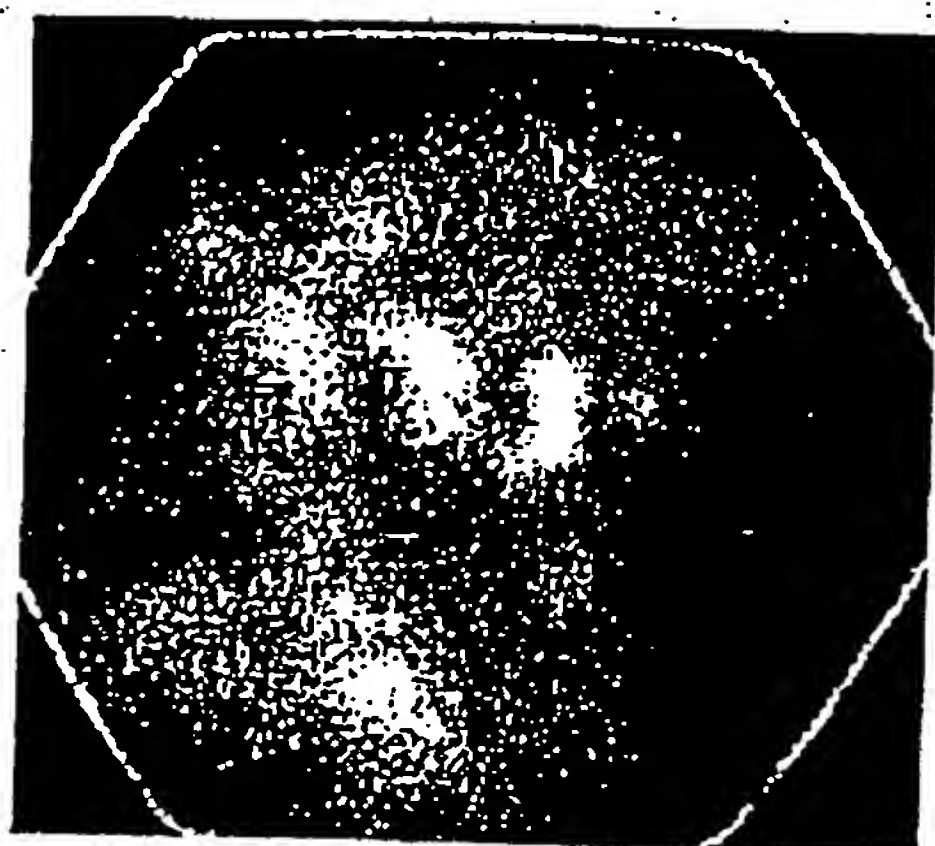


Figure 5a

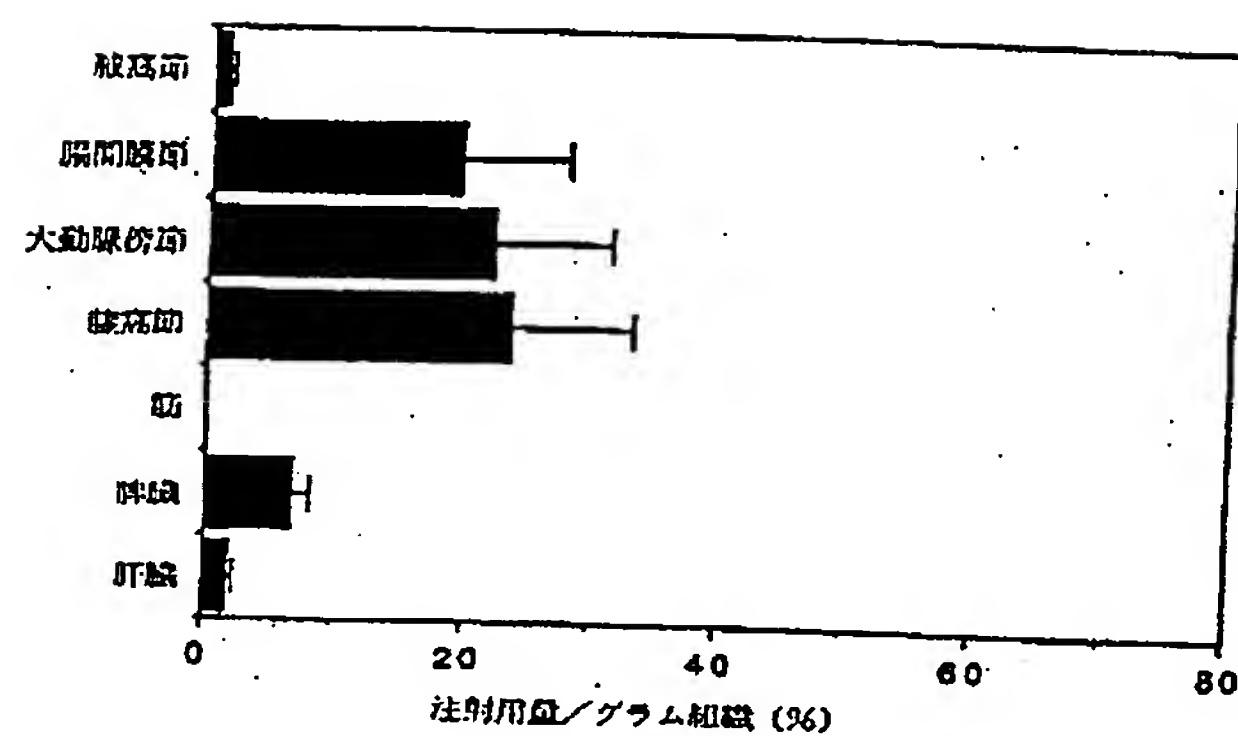


Figure 5b

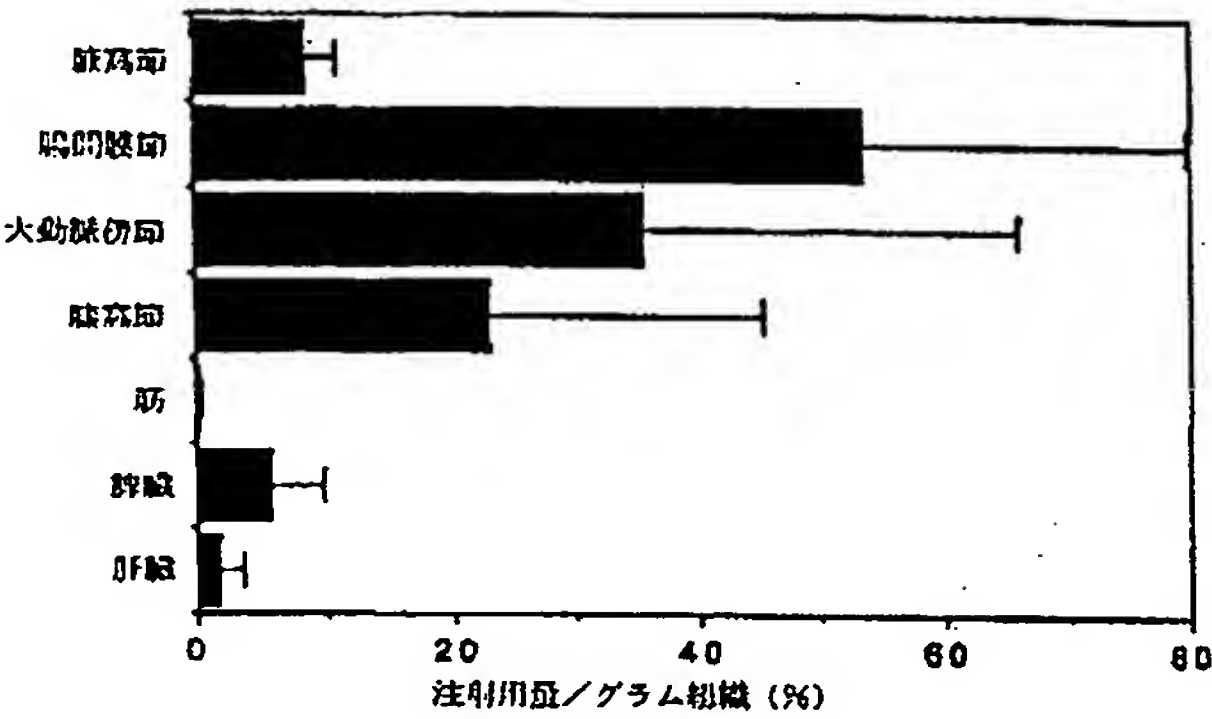


Figure 6

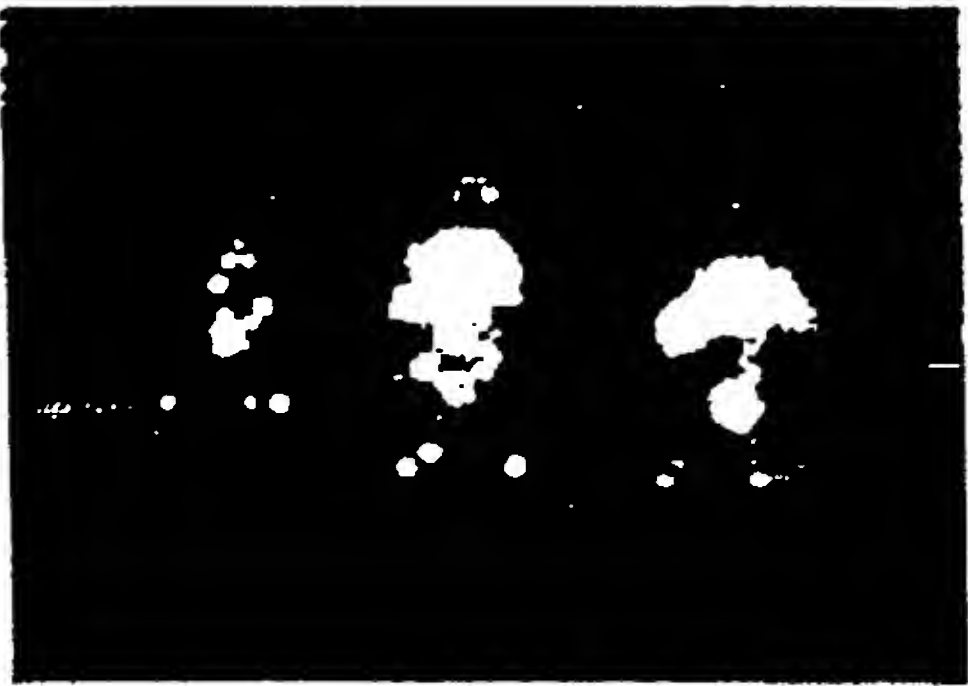


Figure 7

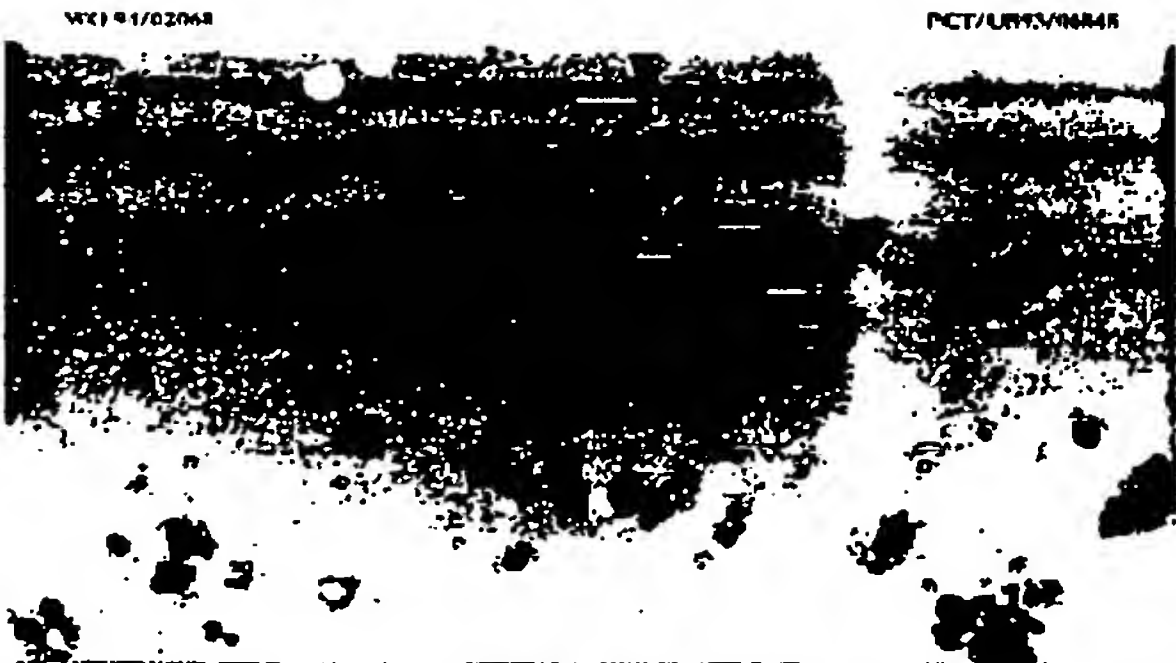
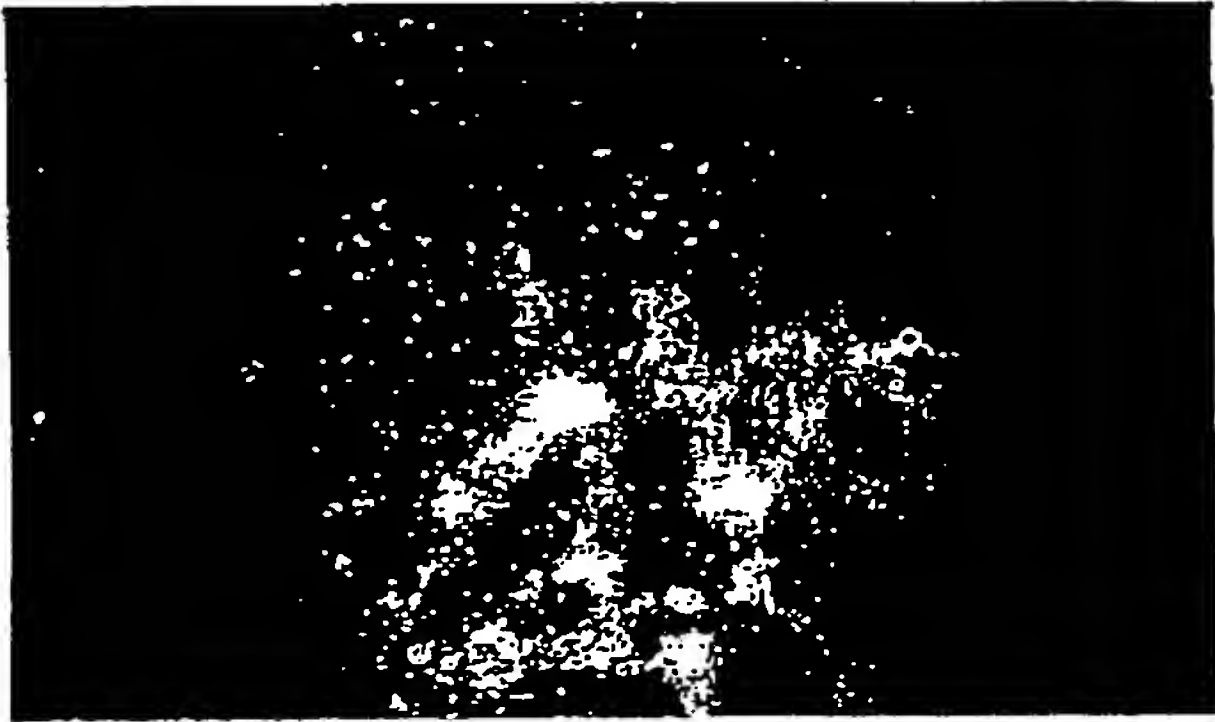


FIG. 8A



FIG. 8B

Figure 9a



Figure 9b



Figure 10a



Figure 10b





國際阿奎報告

Form PCT/ISA/210 (continuation of previous form PCT/ISA/210)

- 18 -

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**This Page Blank (uspto)**